



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

家畜の下痢症関連ウイルスの遺伝的多様性と迅速診断に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-11-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 増田, 恒幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/54520

家畜の下痢症関連ウイルスの遺伝的多様性と
迅速診断に関する研究

2015年

岐阜大学大学院 連合獣医学研究科

増田 恒幸

目 次

緒言	1
第一章 S 遺伝子に大きな欠損を有する PEDV が関与した	
PED 野外症例の発生状況および遺伝子解析	4
序論	5
材料および方法	6
1. 農場の概要と発生状況	6
2. 供試材料	6
3. RVA 抗原検査	7
4. 細菌検査	7
5. 病理組織学的検査	7
6. RNA 抽出	7
7. ウイルス分離	7
8. PEDV および TGEV の RT-PCR およびシーケンス	8
9. 遺伝子解析	9
10. ウイルス抗体検査	9
成績	10
1. 病理解剖, RVA 抗原検査, 細菌検査および病理組織学的検査	10
2. ウイルス分離	10
3. RT-PCR による PEDV および TGEV 遺伝子の検出	10
4. PEDV S 遺伝子増幅産物の比較	11
5. シーケンスデータ解析および系統発生解析	11
6. PED の抗体検査	11
考察	13

図表	16
第二章 搾乳牛の集団下痢症例から分離された	
G15P[14]遺伝子型 A 群ロタウイルスの遺伝子解析	21
序論	22
材料および方法	24
1. 発生状況およびルーチン検査	24
2. RT-PCR による遺伝子検査	24
3. cDNA ライブラリー作製と次世代シーケンス	25
4. シーケンスデータ解析	25
5. ウイルス分離	26
6. 抗体検査	26
成績	27
1. ルーチン検査	27
2. 遺伝子検査	27
3. 次世代シーケンスによる全遺伝子配列の決定とメタゲノム解析	27
4. ウイルス分離	28
5. 抗体検査	29
考察	30
図表	32
第三章 豚下痢症関連ウイルス 4 種を迅速かつ同時に検出する	
リアルタイム RT-PCR 法の開発	39
序論	40
材料および方法	42
1. プライマーおよびプローブ	42

2. qPCR 法の反応条件の検討	42
3. qPCR 法の検出感度および解析性能についての評価	43
4. qPCR 法と gel-based PCR 法の感度比較	43
5. 野外病性鑑定材料	44
6. RNA 抽出および qPCR 法の実施	45
成績	46
1. qPCR 法における各ウイルス遺伝子の検出状況と反応時間	46
2. LOD	46
3. 検量線の評価	46
4. 反復性と再現性	46
5. qPCR 法と gel-based PCR 法の検出感度の比較	47
6. 野外病性鑑定材料への応用	47
考察	48
図表	51
結論	57
謝辞	61
引用文献	62

緒 言

家畜の下痢症は畜産経営上大きな損失を与える要因の一つであり、その原因は多岐にわたるが、ウイルスが多く割合を占めている。家畜のウイルス性下痢として、豚では豚流行性下痢（PED）や伝染性胃腸炎（TGE）が広く知られており、わが国では家畜伝染病予防法に基づく届出伝染病に指定されている。子牛では牛コロナウイルス（BCoV）や牛 A 群ロタウイルス（BRVA）による下痢症がよく報告される。成牛のウイルス性下痢症は集団発生することが多く、BCoV、牛トロウイルス（BToV）、牛 B 群ロタウイルス（BRVB）および牛 C 群ロタウイルス（BRVC）が原因となり（3, 31, 50, 65）、特に乳用牛では乳量低下による経済的被害が大きい。

PED は、PED ウイルス（PEDV）を原因とする嘔吐や水様性下痢、それに伴う脱水を主徴とする豚の急性ウイルス感染症で（61）、臨床症状は TGE のそれと類似している。米国では 2013 年 4 月から 5 月にかけて、初めて PED の発生が確認され、カナダやメキシコを含む北米全体に広まった（13, 83）。日本では 2013 年 10 月に 7 年ぶりにその発生が確認され、2015 年 7 月までに 1,049 農場で発生し、49 万頭が死亡する大流行となり、国内の養豚産業に重大な経済損失をもたらした（農林水産省ホームページ：<http://www.maff.go.jp>）。PEDV はコロナウイルス科アルファコロナウイルス属に分類される 1 本鎖(+)RNA ウイルスで、全遺伝子は約 28,000 塩基から構成される（69）。7 つのオープンリーディングフレーム（ORF）は、ORF1a, ORF1b, スパイク(S), ORF3, エンベロープ(E), メンブレン(M)およびヌクレオカプシド(N)蛋白をコードしている（8, 45）。PEDV は遺伝学的に Group I と Group II に分類される（9）。近年、米国では S 遺伝子の N 末端側に特徴的な欠損と挿入を認める INDEL と呼ばれる株が報告されている（85）。現在では PEDV の全遺伝子解析により、大きく 2 つのクレードの北米流行株に分類され、INDEL タイプの株はクレード 2 に分類

されている (83)。日本国内においても北米流行株と INDEL タイプの株が確認されている (71)。また PEDV では S 遺伝子の N 末端側に大きな欠損を有する変異株が培養細胞由来株において報告されている (56)。PEDV と同属に分類される TGE ウイルス (TGEV) は、細胞継代を繰り返すと徐々にその病原性を失い、組織親和性も消化管から呼吸器へシフトすることが知られており (22, 30)、TGEV の変異株である呼吸器コロナウイルス (PRCV) における S 遺伝子領域の大きな欠損 (N 末端側 227 アミノ酸 (aa)) が病原性の減弱と呼吸器組織への親和性に関連することが確認されている (66, 89)。前述の S 遺伝子領域に大きな欠損を有する PEDV 培養細胞株の欠損部位は PRCV のそれとよく似ているが、PEDV における S 遺伝子領域の欠損が病原性や組織親和性に与える影響などは不明であり、野外株における S 遺伝子の大きな欠損は報告されていない。

RVA はヒトをはじめとする牛、豚、馬などの哺乳類や鳥類に感染し、若齢個体の下痢症における主要な原因として知られている (15, 16, 17, 58)。豚では哺乳豚の下痢症から多く検出されることが知られており (33)、わが国では哺乳豚の下痢症例の約 40% から豚 RVA (PRVA) が検出された報告例がある (35)。RVA はレオウイルス科に属し、6 つの構造タンパク (VP1~4, VP6 および VP7) と 6 つの非構造タンパク (NSP1~6) をコードする 11 本の分節遺伝子を保有する (17)。RVA はウイルス粒子の最外層を形成する VP7 および VP4 蛋白をコードする領域の遺伝子により G および P 遺伝子型分類されており、現在、G は 27 種類、P は 35 種類が確認されている (46)。RVA は、2 種もしくはそれ以上のウイルスが同じ細胞に重感染することにより、遺伝子分節を交換することで遺伝子再集合を起こす (86)。BRVA は主に子牛の下痢症から検出され、その遺伝子型のほとんどが G6 および G10 と P[5] および P[11] の組み合わせである (19, 32)。一方、成牛の下痢症からも BRVA 検出例が報告されているが (20, 57, 67)、例数は少なく、下痢への関与については未だ不明な点が多

い。

家畜の下痢症では迅速な診断とその結果に基づく適切な防疫対応が重要であるが、ウイルスによる下痢症は病態が非常によく似ており、臨床症状から原因ウイルスを同定することは困難であるため、病性鑑定による確定診断が必要となる。これまで培養細胞を使用したウイルス分離や、中和抗体検査などにより診断が行われてきたが、多大な時間と労力を要するため、現在は迅速診断法として逆転写 (RT) -PCR 法が広く用いられている。しかし、牛においては代表的な下痢症関連ウイルス 5 種 (BRVA, BRVB, BRVC, BToV および BCoV) を標的としたマルチプレックス RT-PCR 法が Fukuda らにより確立されているが (21)、豚においては、複数の下痢症関連ウイルスを同時に検出する遺伝子検出系は報告されていない。

本論文は次の三章から構成される。第一章および第二章では筆者は家畜の下痢症において通常とは異なった発生状況を示す症例に着目し、検出されたウイルスの分子生物学的性状を研究した。第一章では S 遺伝子欠損株による PED の発生状況と欠損株の遺伝子解析についての成績を記載した。すなわち、子豚の死亡率がこれまでよりも低い PED の症例において、分離株の全遺伝子解析を行い、野外株としては世界初となる S 遺伝子に大きな欠損を発見した。第二章では、わが国 4 例目となる RVA による成牛の下痢症から、RVA の分離および遺伝子解析を行い、世界初となる G15P[14] 遺伝子型の RVA を確認したので、その成績について記載した。第三章では、家畜の下痢症ウイルスの遺伝的多様性が明らかになり、臨床症状における鑑別が困難であることから、未だ確立されていない豚における下痢症の類症鑑別法を確立するため、S 遺伝子欠損株を含む PEDV、新しく報告された豚デルタコロナウイルス (PDCoV) (7, 34, 84, 87)、近年の国内検出株を含む TGEV および PRVA に対応可能で、迅速かつ一度に同時検出が可能なワンステップリアルタイム RT-PCR (qPCR) 法の開発を行い、その検証試験を野外材料で実施した。

第一章

S 遺伝子に大きな欠損を有する PEDV が関与した PED 野外症例の発生状況および遺伝子解析

序 論

PED は PEDV を原因とする嘔吐や水様性下痢，それに伴う脱水を主徴とする豚の急性ウイルス感染症である (60)。全ての日齢の豚に感染するが，特に若齢豚で症状が重篤化しやすく，哺乳豚での致死率は時に 100%に達する。PEDV はエンベロープを有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスで，コロナウイルス科アルファコロナウイルス属に分類される(61)。PEDV の全遺伝子は約 28,000 塩基で構成され，7 つの ORF はそれぞれ ORF1a, ORF1b, S, ORF3, E, M および N 蛋白をコードしている(8, 45, 69)。このうち S 遺伝子は最も遺伝的多様性が認められる部分である (8)。鳥取県では 2014 年に 2 例の PED が報告されている。そのうちの 1 症例では，従来報告されている PED と異なる発生状況，すなわち哺乳豚の死亡率が極端に低い発生例であった。近年，北米や国内でも報告のある INDEL タイプの株は，その発生農場において，哺乳豚の致死率が低く，S 遺伝子の 5'末端側に特徴的な遺伝子の欠損と挿入 (167,176 および 416 番目にそれぞれ 1,11 および 3 塩基の欠損および 474 と 475 番目の間に 6 塩基の挿入) が認められることが知られている (83, 85)。しかし，本症例から分離された PEDV は S 遺伝子に大きな欠損を認め，遺伝的に INDEL タイプの株と別グループに分類されることが明らかになった。本章では，本症例の病性鑑定成績について述べるとともに，遺伝子解析から分離株の遺伝的特徴について考察した。

材料および方法

1. 農場の概要と発生状況

鳥取県では 2014 年 3 月に一貫経営農場（A 農場）において、初めて PED が発生し、分娩舎において多くの哺乳豚が水様性下痢を呈し、約 7 日間で約 180 頭が死亡または淘汰された。この農場からは北米流行株（高病原性型）と近縁な PEDV が検出された（71）。同年 10 月に鳥取県内の母豚約 500 頭を飼養する子豚生産農場（B 農場）で、3 腹の約 7 日齢の哺乳豚が下痢と嘔吐を発症し、翌日にはさらに 3 腹の哺乳豚が下痢と嘔吐を呈した。B 農場は鳥取県内で初めて PED の発生が認められた A 農場の関連農場であり、毎週、離乳子豚を A 農場へ出荷していた。発症哺乳豚は抗生剤治療には反応せず、元気消失、削瘦を示すものの、子豚の死亡は認められなかった。また分娩室内に嘔吐、食欲不振、元気消失を示す母豚が散見された。発生から 10 日間の発症頭数は母豚 7 頭、哺乳豚 120 頭であったが、その間の哺乳豚の死亡率は約 3.3%と低く、下痢による死亡は確認されなかった。B 農場は農場立ち入り時のシャワーイン、シャワーアウトなど、衛生管理が徹底されていた。また過去半年間は従業員の海外渡航歴もなかった。直近の豚の導入は発生から約 1 週間前であり、県外の PED 未発生農場から繁殖候補豚を導入していた。A および B 農場とも PED ワクチンの使用歴はなかった（表 1-1, 1-2）。

2. 供試材料

2014 年 10 月 27 日に B 農場から臨床症状を呈していた 2～5 日齢の哺乳豚 8 頭を持ち帰り、病理解剖を実施した。全頭から小腸および小腸内容を採材し、イーグル MEM 培地（EMEM）（日水製薬(株)，東京）を用いて 10%乳剤を作製した。3,000 rpm で 10 分間遠心後、上清を 0.45 μm フィルター濾過したものを検査材料とした。また

2014年3月にPEDが発生したA農場においてPEDV陽性であった哺乳豚の小腸および小腸内容を同様に処理し、供試材料とした。

3. RVA 抗原検査

RVAV は、イムノクロマト法（ディップスティック‘栄研‘ロタ（栄研化学(株), 東京)）を用いて検査した。

4. 細菌検査

B農場の8頭の小腸内容を用いて、サルモネラおよび病原性大腸菌の検査を実施した。大腸菌はDHL培地および血液寒天培地にて分離培養，サルモネラはRappaport-Vassiliadis培地による増菌後にDHL培地で分離培養を行い，菌の同定は常法により実施した。

5. 病理組織学的検査

B農場の8頭中6頭から消化管を含む全身諸臓器を採取し，ヘマトキシリン・エオジン染色および国立研究開発法人農研機構 動物衛生研究所より分与された抗PEDVおよびTGEV 兎血清を用いた免疫組織学的検査を実施した。

6. RNA 抽出

検査材料からQIAamp Viral RNA Mini Kit（キアゲン(株), 東京）を用いてRNAを抽出した。

7. ウイルス分離

ウイルス分離は24ウェルプレートを用いて実施した。70～80%シート上とした状

態の Vero-KY5 細胞を 10 µg/ml トリプシン（日本 BD（株），東京）添加 EMEM（日水製薬（株），東京）（T-EMEM）で 3 回洗浄し，最終濃度 20 µg/ml になるようトリプシンを添加した被検材料を 200 µl 各ウェルに接種して 37 °C で 60 分感作させた。その後，接種材料を除去し，T-EMEM で 1 回洗浄した後，T-EMEM を 1 ml 加え，静置培養を行った。細胞変性効果（CPE）が観察されたら培養上清を回収し，CPE が認められない場合は 3 日目に盲継代を行い，さらに 2 回同様の継代を実施した。

8. PEDV および TGEV の RT-PCR およびシーケンス

PEDV および TGEV 遺伝子を検出するために，PEDV および TGEV の S 遺伝子を標的としたプライマーによる RT-PCR (38) を，One-Step RT-PCR Kit (キアゲン(株)，東京) を用いて実施した。

また，近年 PEDV では S 遺伝子に変異を認める株が報告されていることから，S 遺伝子の変異を確認するため，A 農場および B 農場の病性鑑定に供した哺乳豚の小腸乳剤由来材料および分離ウイルスを用いて ORF1b 領域の 5' 末端側と S 遺伝子の 3' 末端側の約 1,500 bp を標的とした RT-PCR (45) を実施した。

B 農場由来 PEDV 株の S 遺伝子全長を決定するため，S 遺伝子の増幅産物をクローニングし，ダイターミネーター法を実施して，ABI PRISM 3130 (Life Technologies, Carlsbad, U.S.A) を用いて解析した。

B 農場由来 PEDV 株の全遺伝子の配列を決定するためには，次世代シーケンスを実施した。米国由来の PEDV74 株を基にプライマーを 8 組作成し，PEDV 全遺伝子を重複してカバーする約 5 kb の PCR 産物を，PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit (タカラバイオ(株)，滋賀) を用いて作成した。PCR 産物を等量プールし，ライブラリーを作製後，次世代シーケンサー (Ion Torrent PGM , Life Technologies, Carlsbad, U.S.A) を用いて遺伝子解析を実施した。

9. 遺伝子解析

得られたシーケンスデータは専用の解析ソフトウェア (Torrent Suite 4.2, Life Technologies) で解析し, Tottori2 株の全遺伝子配列を決定した。S 遺伝子と全遺伝子の塩基配列による分子系統樹解析は, MEGA6 プログラム (74) で GDR モデルによる最尤法を用いて実施し, ブーツストラップ解析は 1000 回繰り返して行った。

10. ウイルス抗体検査

2014 年 10 月 28 日に B 農場の分娩舎の繁殖豚 5 頭, 母豚舎の繁殖豚 5 頭および繁殖候補豚舎の繁殖候補豚 5 頭から採血を行い, 血清を検査に用いた。また, 導入後 3 週目に実施された導入豚の健康検査 (2014 年 4 月 7 日 : 9 頭, 5 月 7 日 : 10 頭, 7 月 14 日 : 10 頭, 9 月 16 日 : 10 頭および 11 月 4 日 : 10 頭) の余剰保存血清も検査に供した。被検血清は 56 °C で 30 分間非働化处理を実施した。PEDV に対する中和抗体検査は 96 ウェルマイクロプレートを用いて血清希釈法にておこなった。使用細胞は Vero-KY5 細胞, 中和用ウイルスには PEDV NK94P6Tr(-)株 (78) を用いた。

成 績

1. 病理解剖，RVA 抗原検査，細菌検査および病理組織学的検査

生体で搬入された B 農場の哺乳豚 8 頭を放血殺後，剖検に供した。病理解剖の結果，7 頭の消化管内容は黄色泥状で，そのうち 1 頭の胃内に凝乳塊が充満していた。残り 1 頭の消化管には内容が認められず，小腸および大腸壁は中程度にひ薄化していた。RVA 抗原検出キット検査では陰性であった。また，細菌学的検査の結果，サルモネラおよび病原性大腸菌は分離されなかった。

病理組織学的検査の結果，検査に供した 6 頭全てに小腸粘膜上皮細胞の空胞変性，絨毛の萎縮，癒合およびひ薄化が認められた。一部の個体でまれに大腸粘膜上皮細胞にも空胞変性が認められた。抗 PEDV 兔血清を用いた免疫組織化学的検査では，6 頭全てに小腸粘膜上皮細胞の細胞質に陽性抗原が散見された。一方，抗 TGEV 兔血清を用いた検査では陽性抗原は確認されなかった。

2. ウイルス分離

B 農場の 8 検体を接種した Vero-KY5 細胞のうち 1 検体において，継代 2 代目に空胞化とシンシチウム形成を特徴とする CPE が認められた（図 1-1）。また CPE が認められた培養上清で実施した PEDV 標的の RT-PCR は陽性を示した。B 農場由来の分離された PEDV を Tottori2 株と命名した。

3. RT-PCR による PEDV および TGEV 遺伝子の検出

B 農場の小腸乳剤は，PEDV S 遺伝子を標的とした RT-PCR で全検体陽性を示したが，TGEV S 遺伝子の RT-PCR は全て陰性であった。

4. PEDV S 遺伝子増幅産物の比較

プライマーセット S1-20320-F および S1-21816-R を用いた RT-PCR において、B 農場の小腸乳剤 8 検体および分離ウイルス (Tottori2 株) では約 860 bp の PCR 増幅産物が確認された。一方、A 農場の小腸乳剤由来 PEDV (Tottori1 株) および NK94P6Tr(-)株の PCR 増幅産物は B 農場由来の Tottori2 株より約 600 bp 大きく、約 1,500 bp であった (図 1-2)。

5. シークエンスデータ解析および系統樹解析

S 遺伝子全長解析の結果、Tottori2 株は S1 領域の前半部分に大きな欠損が確認された。欠損部分の大きさは 582 塩基 (194aa) であった。BLAST プログラムによる相同性解析の結果、Tottori2 株は米国で 2013 年に分離された組織培養馴化株 PEDV TC-PC177 株 (56) と高い相同性を示し、その塩基配列の一致率は 97.89% であった。Tottori2 株における S 遺伝子の欠損は、TC-PC177 株のそれと類似していたが、Tottori2 株の欠損開始部位は 11aa、終了部位は 14aa それぞれ N 端側にずれていた。(図 1-3)。

Tottori2 株の全遺伝子は 27,342 塩基から構成されていた。相同性解析の結果、Tottori-2 株は全遺伝子配列が登録されている既知の米国由来株と高い相同性を示し、その塩基配列の一致率は 99.64% から 99.87% であり、最も相同性が高かったのは Iowa103 株であった。INDEL タイプの株との一致率は 98.90 から 99.45% であった。欠損部位以外は Tottori1 株と高い相同性があり、その一致率は 99.75% であった。S 遺伝子および遺伝子全長いずれの系統樹においても、Tottori2 株は INDEL タイプの株とは異なる北米流行株と同じクラスターに分類された (図 1-4)。

6. PED の抗体検査

検査した分娩舎の母豚は5頭中2頭がPEDVに対して16および256倍の中和抗体を保有していた。母豚舎の繁殖豚は5頭中4頭が32～64倍の中和抗体を保有し、繁殖候補舎の豚は5頭中4頭が2～64倍のばらついた中和抗体を示した。また、保存血清の検査では、2014年4月7日から9月16日までに採血した39頭の豚は全てPEDVに対する中和抗体を保有していなかったが、発生後の11月4日に採血した豚は10頭全てが、32～128倍の中和抗体を保有していた。

考 察

鳥取県において 2014 年 3 月に A 農場で、10 月に関連農場である B 農場で PEDV が発生し、B 農場から分離された Tottori2 株には S 遺伝子領域に 582 塩基 (194aa) の大きな欠損が認められた。欠損部位は S 遺伝子のアミノ酸配列で 23 番目から 217 番目の位置であった。このような大きな欠損を持つ PEDV 株は米国において培養細胞由来株 (TC-PC177 株) での報告があるのみで (56)、野外症例では世界で初めての報告である。また Tottori2 株は、欠損部位以外は既知の米国由来 PEDV のそれと相溶性が高いことから、Tottori2 株と近年の米国流行株とは同じ祖先から分化した可能性が示唆された。

A 農場では分娩舎で哺乳豚の激しい水様性下痢が確認され約 7 日間で約 180 頭の哺乳豚が死亡または淘汰されたが、母豚の臨床症状は顕著ではなかった。一方、B 農場では哺乳豚で下痢や嘔吐が認められるものの死亡する子豚は認められなかったが、母豚に嘔吐、食欲不振などの A 農場では認められなかった臨床症状が確認された。A および B 農場は、発生時にはどちらも PEDV ワクチン未接種であったため、両農場の発生状況の差異はウイルス株の病原性の違いによるものであることが強く示唆された。国内でも分離例のある INDEL タイプの株は S 遺伝子の 5' 末端側に特徴的な遺伝子の欠損と挿入が認められ、その発生農場では哺乳豚の致死率は低いという報告もある (83, 85)。

PEDV と同属である TGEV の変異株と考えられている PRCV は S 遺伝子領域に 227aa の欠損が認められており (89)、元株の TGEV とは異なった呼吸器系細胞への組織親和性を有し、病原性も減弱化されている (66)。今回の分離株の遺伝子の欠損位置とサイズは、この報告のそれと極めて類似している。S 遺伝子のコードするスパイク蛋白はウイルスの受容体結合および細胞内侵入を司る。現在 PEDV では S 遺伝

子の変異が病原性に影響を与えるという報告はないものの、S 遺伝子の大きな欠損が哺乳豚の致死率の低減や母豚への臨床症状として現れた可能性は否定できない。B 農場で PED を発症した哺乳豚の呼吸器系組織の PEDV に対する免疫染色を実施したが、その部位に PEDV は確認できず、組織親和性が消化管から呼吸器系へシフトしている可能性は低いと考えられた。

B 農場の保存血清を用いた PEDV の中和抗体検査では、9 月までに採血した 39 頭全て陰性であったが、11 月に採血した 10 頭は全て 32~128 倍の高い中和抗体価を保有していた。導入元では PED の発生が報告されていないため、導入豚は B 農場へ導入後に PEDV に感染したと考えられた。このため B 農場への PEDV の侵入は 9 月の下旬から 10 月の月上旬であると推察された。疫学関連農場である A 農場で PED が 2014 年 3 月 12 日に発生しているが、発生後直ちに哺乳豚を全頭殺処分し、伝播防止等の防疫対策を実施し、3 月末には沈静化している。A 農場と B 農場では従業員がそれぞれ固定されており、従業員同士の行き来はない。また A 農場ではこのような S 遺伝子に欠損を伴う PEDV は確認されていない。欠損を有する以外は Tottori2 株と Tottori1 株の相同性は高かったが、これらの理由から A 農場から B 農場へ PEDV が伝播した可能性は低いと考えられる。Tottori2 株は北米流行株と高い相同性を保有していたため、海外からの侵入も考えられたが、B 農場の従業員には直近の海外渡航歴もなく、現在のところ侵入経路は不明のままである。

今回、B 農場から分離された Tottori2 株は S 遺伝子に大きな欠損が認められた。哺乳豚の死亡率が低いことから、従来の PEDV より病原性が低下している可能性が示唆された。PEDV については我が国への進入経路や国内での蔓延経路など、未だ解明されていないことが多い。本疾病は畜産経営に大打撃を与える恐ろしい伝染病であり、清浄化が望まれる。今回分離された Tottori2 株については更なる確認が必要ではあるものの、病原性は低いと推察されることから、効果的な弱毒ワクチンの候補となり、

PED の予防に寄与することが期待される。

表 1-1 発生農場の概要

農場	飼養形態	飼養規模			豚導入		入退場時 シャワー	PED ワクチン
		母豚	子豚	肥育	繁殖候補豚	子豚		
A	一貫経営	100	4700		県外	B農場	有	未接種
B	子豚生産	565	680	0	県外	—	有	未接種

表 1-2 発生状況の比較

農場	発生日	哺乳豚の被害				母豚の臨床症状
		発症	死亡	淘汰	治療の有無	
A	2014/3/12	177	79	98	無	顕著ではない
B	2014/10/27	127	1*	0	有	元気消失・食欲不振

*：母豚による圧死

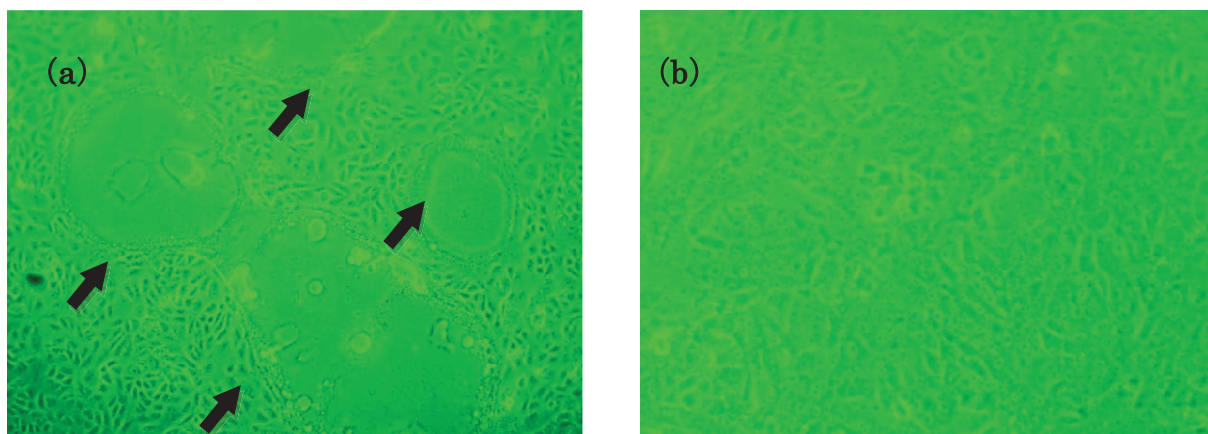


図 1-1 Vero-KY5 細胞における Tottori2 株の CPE

(a) Tottori-2 感染 Vero-KY5 細胞 (接種 24 時間後) (b) 非感染 Vero-KY5 細胞

矢印：細胞の空胞化およびシンシチウム形成

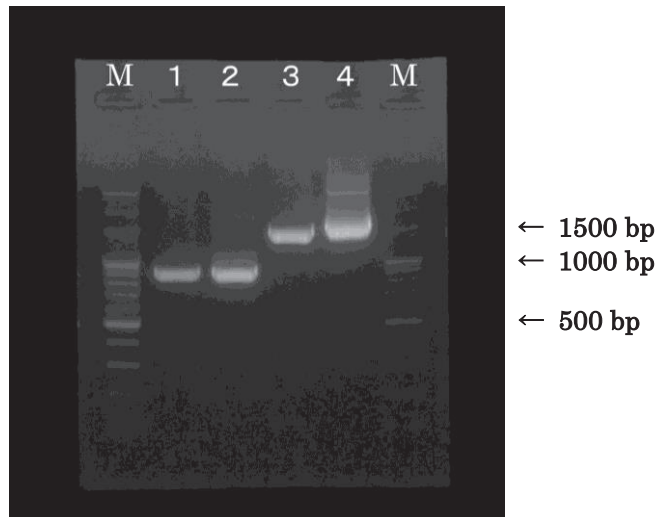


図 1-2 S1-20320-F・S1-21816-R プライマーセットを用いた Tottori1 株および Tottori2 株の PEDV S 遺伝子領域増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

- 1 : Tottori2 株 (細胞培養上清)
- 2 : Tottori2 株 (小腸乳剤)
- 3 : Tottori1 株 (小腸乳剤)
- 4 : PEDV NK94P6Tr(-)株 (細胞培養上清)
- M : 100 bp DNA Ladder

```

Colorado/USA/2013 1:MKSLTYFWLFLPVLSTLSLPQDVTRCSANTNFRFRFFSKFNVQAPAVVVLGGYLPIGENQG 60
Tottori2/JPN/2014 1:MKSLTYFWLFLPVLPTLSLPQD----- 22
PC177/USA/2013 1:MKSLTYFWLFLPVLSTLSLPQDVTRCSANTNFR----- 33
*****.*****

Colorado/USA/2013 61:VNSTWYCAGQHPTASGVHGI FVSHIRGGHGFEIGISQEPFDPSPGYQLYLHKATNGTNTAT 120
Tottori2/JPN/2014 22:----- 22
PC177/USA/2013 33:----- 33

Colorado/USA/2013 121:ARLRICQFPSIKTLGPTANNDVTTGRNCLFNKAI PAHMSEHSVVGITWDNDRVTVFSDKI 180
Tottori2/JPN/2014 22:----- 22
PC177/USA/2013 33:----- 33

Colorado/USA/2013 181:YYFYFKNDWSRVATKCYNSGGCAMQYVYEPTYMYMLNVTSAGEDGISYQPCTANCIGYAAN 240
Tottori2/JPN/2014 23:-----VTSAGEDGISYQPCTANCIGYAAN 46
PC177/USA/2013 34:-----TANCIGYAAN 43
*****

Colorado/USA/2013 241:VFATEPNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVHGKVVSNQPLLVNCLLAIPKIYGLGQFFSFN 300
Tottori2/JPN/2014 47:VFATEPNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVHGKVVSNQPLLVNCLLAIPKIYGLGQFFSFN 106
PC177/USA/2013 44:VFATEPNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVHGKVVSNQPLLVNCLLAIPKIYGLGQFFSFN 103
*****

Colorado/USA/2013 301:QTIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALGTNFSFVCSNSSNPHLATF 360
Tottori2/JPN/2014 107:QTIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALGTNFSFVCSNSSNPHLATF 166
PC177/USA/2013 104:QTIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALGTNFSFVCSNSSNPHLATF 163
*****

Colorado/USA/2013 361:AIPLGATQVPYYCFLKVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNGFGYLHLGLLD 420
Tottori2/JPN/2014 167:AIPLGATQVPYYCFLKVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNGFGYLHLGLLD 226
PC177/USA/2013 164:AIPLGATQVPYYCFLKVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNGFGYLHLGLLD 223
*****

```

図 1-3 Tottori2 株を含む 3 株の PEDV S 遺伝子のアミノ酸部分配列 (aa1-420)

Colorad/USA/2013 : 米国由来高病原性株

PC177/USA/2013 : TC-PC177 株 (S 遺伝子 197aa 欠損株)

* : 3 株で保存されているアミノ酸残基を示す

- : 欠損を示す

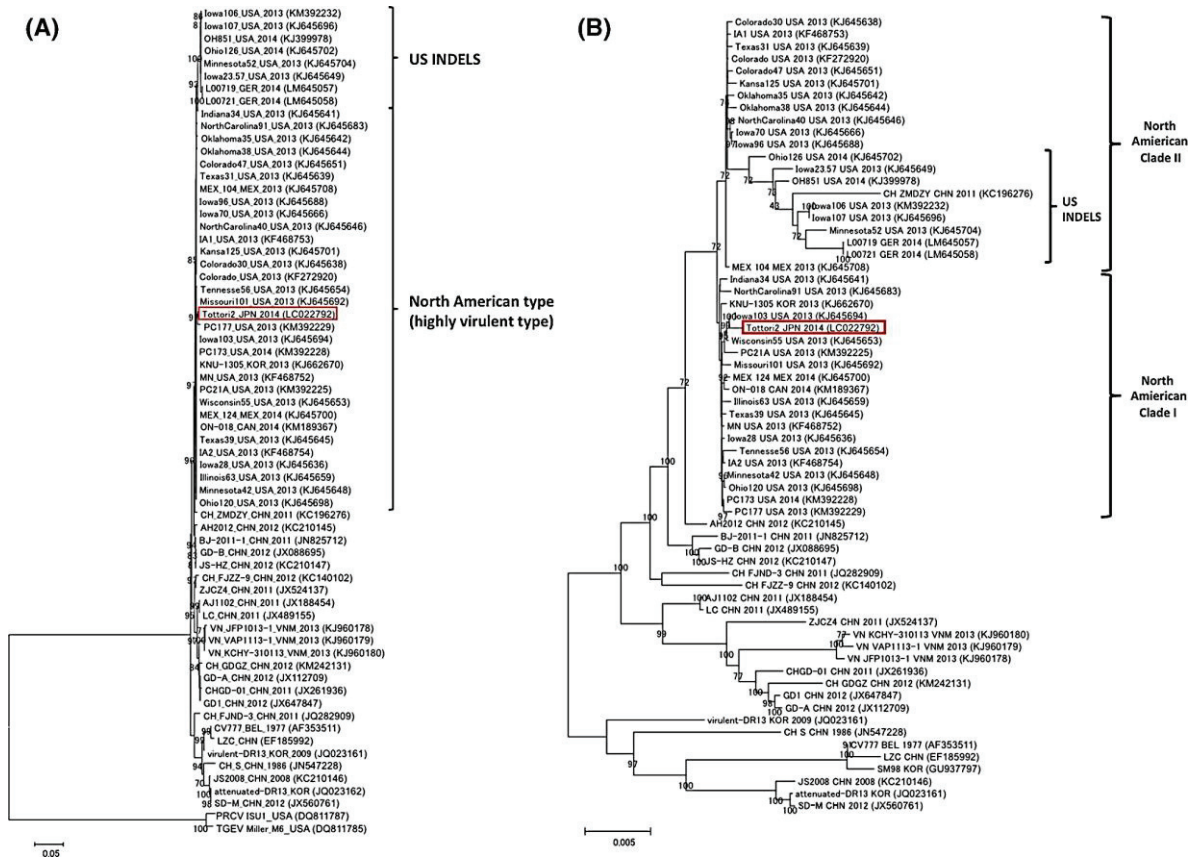


図 1-4 Tottori2 株と GenBank データベースから得た PEDV の S 遺伝子塩基配列

(A) および全遺伝子塩基配列 (B) に基づく分子系統樹。赤枠は Tottori2 株を示す。

TGEV および PRCV をアウターグループとして解析した。ブーツストラップ値を各クラスターの分岐に示す。

第二章

搾乳牛の集団下痢症例から分離された
G15P[14]遺伝子型 A 群ロタウイルスの遺伝子解析

序 論

RVA は若齢動物における重要な下痢症の原因の1つである (15, 58)。RVA は正20面体構造を持つ、エンベロープを保有しないウイルスで、レオウイルス科に属する。ロタウイルスの遺伝子は、6つの構造タンパク (VP1~4, VP6 および VP7) と5つの非構造タンパク (NSP1~6) をコードする11本の分節化したRNAから構成される (17)。RVA は中和抗体を誘導する2種の外殻蛋白 VP7 および VP4 の遺伝子配列により、それぞれ G 型, P 型に分類される。近年、多様な遺伝子型および遺伝子再集合が報告されたことから、新しい RVA 遺伝子型の分類が必要となった。そこで2008年、Rotavirus Classification Working Group (RCWG) はロタウイルスの全11遺伝子分節の配列に基づく遺伝子型別を提唱し、ロタウイルス蛋白 VP7- VP4- VP6- VP1- VP2- VP3- NSP1- NSP2- NSP3- NSP4- NSP5 の各遺伝子型を、GX- P[X]- IX- RX- CX- MX- AX- NX- TX- EX- HX (X は遺伝子型番号を示す) と表記することとした (46)。RVA は高率に遺伝子再集合を起こすことが知られており、その抗原性や病原性は多様である (76)。遺伝子再集合はオルソミクスウイルス科、ブニヤウイルス科、ロタウイルスを含むレオウイルス科など多くのウイルス科に属するウイルスで確認されている (86)。

遺伝子型の多様性や遺伝子再集合を調べるにはシーケンスが必要であるが、近年、次世代シーケンスが開発され、ウイルス検査にも応用されるようになった。次世代シーケンサーは従来のサンガー法とは異なる手法によりシーケンスを行い、1つのサンプルから何百万もの遺伝子配列を得る高性能配列解析を行うことが可能である (68)。この方法は特定のプライマーを必要しないことから、遺伝子情報のない病原体の検出および同定が可能である (43)。

RVA は乳幼児において最も発生頻度の高い下痢症の原因である (17)。一方、成人

については偶蹄類宿主からの伝播が疑われる RVA による下痢症が数例報告されているが (29, 51), 成人に対する RVA の病原性は解明されていない (4)。牛や豚においても同様に, 幼獣の下痢症の原因として知られている (15, 17, 33)。しかし, 牛においても, RVA による成牛の下痢症の報告は数例あるのみで, その実態は不明である (20, 57, 67)。

2013 年 2 月に鳥取県で乳量減少を伴う成牛の水様性下痢が発生し, 病性鑑定の結果, 搾乳牛から RVA が検出された。RVA による成牛の集団下痢症の報告は稀有であるため, 検出された RVA の全遺伝子配列を次世代シーケンサーにより解読し, 遺伝子型別および分子疫学解析を行った。

材料および方法

1. 発生状況およびルーチン検査

2013年2月、ホルスタイン種搾乳牛42頭を飼養する酪農家で、搾乳牛2頭が突然、元気消失、水様性の下痢を発症した。続いて隣接する3頭が同様の水様性下痢を呈し、1週間のうちに下痢は牛舎全体に蔓延して搾乳牛全頭が同様の症状を示した。便の性状は緑黄色水様で、血液の混入は認められなかった。発症牛は全頭約1週間で回復したが、農場では初発から約2週間、乳量の減少が確認された。搾乳牛に下痢が流行している間、仔牛に下痢症は見られなかった。この農場の飼養牛は全て自家産で外部からの牛の導入はなく、年2回実施しているバルク乳を用いたペスチウイルス属を標的とした遺伝子検査(82)においても牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)陰性が確認されている。

初発の翌日に発生農場に立ち入り、下痢を呈した5頭から糞便を採取すると共に、発生状況について調査を行った。ルーチン検査として、イムノクロマト法(ディップスティック‘栄研’ロタ)を用いて、5頭の糞便のRVA検査を実施した。サルモネラ検査は5頭の糞便をハーナーテトラチオン塩酸培地にて37℃で一晩増菌後、ノボビオシン加DHL培地にて37℃で24時間静置培養を実施した。毒素原生大腸菌線毛(K99)抗原はイムノクロマト法(Test strips for the detection of E. Coli F5 (K99) BIO K 154, Bio-X Diagnostick, ベルギー)により実施し、寄生虫検査はショ糖浮遊法により実施した。

2. RT-PCRによる遺伝子検査

RVA, BCoV, BToV, BRVB, BRVC および BVDV の遺伝子の検出は、下痢便 10% 乳剤を細胞培養用無血清培地「GIT」(GIT) (和光純薬(株), 東京) で作製し、その遠

心上清を 0.45 μm フィルター濾過したものを検体とし、QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン(株), 東京) を用いて RNA を抽出後、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (キアゲン(株)) を用いて、既報に準じて RT-PCR (21, 28, 79, 82) により実施した。

3. cDNA ライブラリー作製と次世代シーケンス

糞便から滅菌 PBS で 10%懸濁液を作成し、ISGEN LS (日本ジーン(株), 東京) を用いてウイルス RNA を抽出後、DNase I 処理を実施した(タカラバイオ(株), 滋賀)。抽出 RNA 濃度を Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA) で測定し、1 検体当たり 10~100 ng の RNA を cDNA ライブラリー作製に用いた。ライブラリーの作製は NEBNext[®] Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina Version 1.0 (New England Biolabs, Ipswich, USA) を用いて実施し、最終 cDNA の濃度を Bioanalyzer[®] (Agilent technologies, Santa Clara, USA) と Qubit[®] 2.0 Fluorometer を用いて調整した後、MiSeq bench-top sequencer (Illumina, San Diego, USA) にアプライした。シーケンスは 151 サイクルのシングルエンドリードによるモードで行った。

4. シーケンスデータ解析

得られたデータは Miseq reporter program (Illumina) を用いて fastaQ ファイルに変換し、CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark) にインポートした。作成されたシーケンスリードは CLC Genomics Workbench の *de novo* assembly コマンドにより 300 塩基以上のコンティグを構築し、NCBI BLAST プログラムを用いて解析を行った。RVA 遺伝子と判明したコンティグと BLAST 解析で最も相同性の高かった RVA 参照株を用いて、CLC Genomics Workbench のマッピング機能により各遺伝子分節の塩基配列を決定した。塩基配列は ClustalW を用いてアライメントし、MEGA5.22 (73) を用いて近隣接合法による系統樹解析を実施した。ブ

ーツストラップ解析は 1000 回繰り返した。ペアワイス相同性の解析は CLC Genomics Workbench で行った。

5. ウイルス分離

ウイルス分離には RVA を検出するイムノクロマト法で強陽性反応を示した 3 検体を用いた。作製した下痢便 10%乳剤を GIT にて 10 倍希釈し、アセチルトリプシン (Sigma-Aldrich(株), 東京) を $10 \mu\text{g/ml}$ となるよう添加した。37 °C で 30 分感作した後、細胞に接種した。細胞は単層に発育させたアカゲザル腎由来株化 (MA104) 細胞およびヒト直腸由来株化 (HRT-18) 細胞を GIT で 2 回洗浄して使用した。37 °C, 5% CO₂ の条件下で回転培養を実施し、分離の有無は CPE を指標にした。CPE が認められない場合は 7 日間隔で 3 代盲継代を行った。また CPE が認められた MA104 細胞の培養上清はイムノクロマト法 (ディップスティック ‘栄研’ロタ) により RVA の有無を調べた。

6. 抗体検査

発症時と 3 週間後の血清を採材し, BCoV, 牛アデノウイルス 7 型 (BAdV7), BVDV1 型および 2 型に対するウイルス中和試験を実施した。中和用ウイルスには, BCoV は Mebus 株, BAdV7 型は袋井株, BVDV1 型は Nose 株および BVDV2 型は KZ91-CP 株を用いた。培養細胞は BVDV1 および 2 型に対しては MDBK-SY 細胞, BCoV に対しては HRT-18 細胞, BAdV7 に対しては牛精巢細胞をそれぞれ使用した。

成 績

1. ルーチン検査

イムノクロマト法（ディップスティック‘栄研’ロタ）では下痢を呈していた5頭全ての糞便は陽性となった。下痢症の原因となり得る細菌，原虫および寄生虫は検出されなかった。

2. 遺伝子検査

RT-PCRにおいても5頭全てからRVA特異遺伝子が検出され，BCoV, BToV, RVB, RVC および BVDV 遺伝子は検出されなかった。

3. 次世代シーケンスによる全遺伝子配列の決定とメタゲノム解析

MiSeq による次世代シーケンスで5頭の糞便全てから，RVAの11本のRNA分節の遺伝子配列が得られ，それらは全て同一株であることが確認された。これらの株のVP7- VP4- VP6- VP1- VP2- VP3- NSP1- NSP2- NSP4- NSP5における遺伝子型はRotaC遺伝子型別ツール(42)を用いて，それぞれG15- P[14]- I2- R2- C2- M3- A3- N2- T6- E2- H3 と同定され，RVA/Cow-wt/JPN/Tottori-SG/2013/G15P[14]（Tottori-SG株）と命名された。11本の遺伝子の塩基配列はDNA Data Bank of Japanに登録した（アクセッション番号：AB853890~AB853900）。VP7遺伝子の塩基配列を用いた系統樹解析では，Tottori-SG株はアルゼンチンの株であるRVA/Cow-wt/ARGB383/1998/G15P[11]（23，47）およびインドで検出された遺伝子型G15P[11]，G15P[21]に分類される3株（25，62）と独立したクラスターを形成した（図2-1（A））。他のG15株に対するTottori-SG株のVP7の塩基およびアミノ酸配列の相同性はそれぞれ87.9~89.9%，91.7~92.9%であった。VP4遺伝子の塩基配列

による系統樹では、Tottori-SG 株は RVA/Cow-tc/JPN/Sun9/2000G8P[14] (18) および RVA/Human-tc/THA/Mc35/XXXX/G10P[14] (43) とクラスターを形成した (図 2-1 (B))。Tottori-SG 株とわが国の分離株である Sun9 株との VP4 の塩基およびアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 95.8%および 97.2%と高く、人由来の Mc35 株とはそれぞれ 89.7%および 95.6%であった。VP6 遺伝子の系統樹ではわが国の牛から分離された希少な遺伝子型の株である RVA/Cow-wt/JPN/AzuK-1/2006/G21P[29] (AzuK-1 株) (2) および RVA/Cow-wt/JPN/Dai-10/2008/G24P[33] (Dai-10 株) (1) とともに、南アフリカのサル由来株である RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-N5/1958/G3P[2] (SA11-N5 株) (53) とクラスターを形成した (図 2-1 (C))。Tottori-SG 株の VP6 遺伝子における AzuK-1 株, Dai-10 株および SA11-N5 株に対する相同性は、塩基配列でそれぞれ 96.0%, 96.6%および 95.2%であった。またインドで分離された RVA/Cow-wt/IND/RUBV51/2005G15P[21] (RUBV51 株) との相同性が高く、92.8%であった。VP1, VP2, VP3, NSP2, NSP3, NSP4 および NSP5 遺伝子は牛や牛に近い動物由来株とクラスターを形成していた (図 2-1 (D~F), (H~K))。同様に、NSP1 遺伝子はサル由来の G8P[1]株 (49) および人由来の G6P[14]株 (47) とクラスターを形成していた (図 2-1 (G))。Tottori-SG 株の 11 本全ての遺伝子分節の塩基配列は牛や牛に近い動物由来株と比較的相同性が高く (表 2-1), VP7 遺伝子以外はわが国の牛由来株と高い相同性があった (表 2-2)。

なお次世代シーケンスでは RVA 以外の既知の病原体遺伝子は検出されなかった。

4. ウイルス分離

ウイルス分離では MA104 細胞に接種した 3 検体中全てに接種 2 または 3 代目で CPE が観察された (図 2-2)。CPE が観察された培養上清は免疫クロマト法 (ディップスティック ‘栄研’ ロタ) でいずれも陽性を示した。

5. 抗体検査

下痢を発症した 5 頭のペア血清を用いた中和抗体検査では BCoV, BAdV7, BVDV1 および 2 型に対する有意な抗体上昇は認められなかった。

考 察

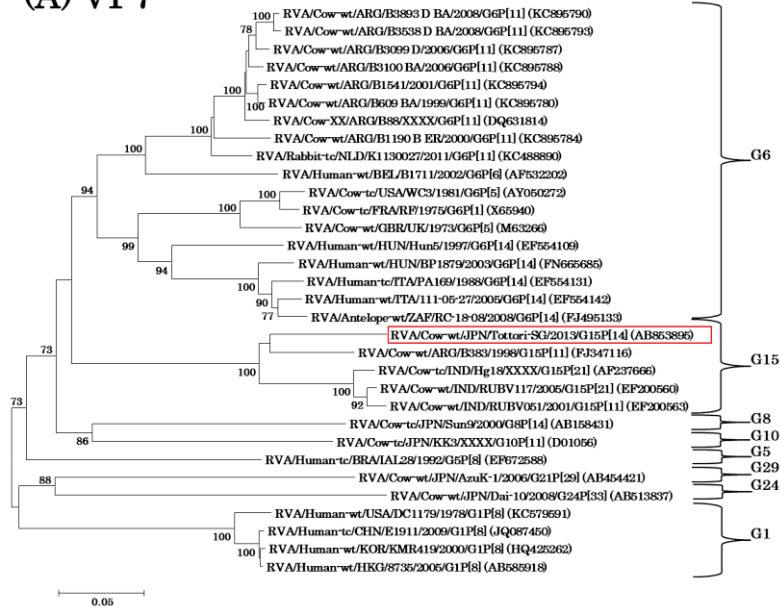
わが国では、主に G6 および G10 遺伝子型の RVA が分布している (32)。一方、G15 遺伝子型の株はこれまで見つかっておらず、GeneBank データベースに海外の 5 株が登録されているだけである。G15 遺伝子型は全て牛からのみしか検出されておらず、インドの G15P[21] 遺伝子型の 3 株 (25, 62) と、アルゼンチンおよびインドの G15P[11] 遺伝子型の 2 株でのみある (25, 47)。Tottori-SG 株は世界で 6 番目に見つかった G15 遺伝子型であり、G15P[14] 遺伝子型の組み合わせは世界初である。Tottori-SG 株の VP7 遺伝子と他の G15 遺伝子型株との塩基配列の相同性が高くなかったことは、Tottori-SG 株はこれまでの G15 遺伝子株とは異なった独自の起源をもつことが推察された。一方、RVA の P[14] 遺伝子型はウサギ (11)、ヒト (5, 14, 24, 47, 48, 80)、ヤギ、カモシカ (26)、ヒツジ (12)、ラマ (59) および牛 (10, 18) から検出されており、最近の研究ではヒト由来 RVA の P[14] 遺伝子型株と偶蹄類由来株との関連性が示唆されている (47)。わが国において RVA の P[14] 遺伝子型は、仔牛から分離された Sun9 株 1 株のみが報告されており (18)、ヒトを含むその他の動物種での検出例はない。Tottori-SG 株は VP4 遺伝子において Sun9 株と高い相同性が確認された。Sun9 株は国内唯一の G[14] 遺伝子型株であるため、Tottori-SG 株または Sun9 株タイプの株の国内飼養牛における浸潤状況を調査する必要があると思われる。

VP7 および VP4 遺伝子以外の解析の結果、Tottori-SG 株の構造または非構造タンパク遺伝子は牛および牛に近い動物由来の RVA と高い相同性を示したことから、Tottori-SG 株は牛に適応した株であるのかもしれない。NSP1 遺伝子はサル由来の PTRV 株 (G8P[1]) とヒト由来の PA169 株 (G6P[14]) と同じクラスターを形成しており、これは反芻動物から伝播した結果だと考えられた (49)。興味深いことに

Tottori-SG 株の VP6 遺伝子はインドで分離された牛由来の RUBV51 株 (G15P[21]), 南アフリカのサル由来株と同様に, わが国の希少な遺伝子型の牛由来株である Dai-10 株 (G24P[33]) および AzuK-1 株 (G21P[29]) と近縁であった。このことから Tottori-SG 株は日本で流行している BRVA が複数の遺伝子再集合を起こして作出された株と考えられた。

成牛の流行性下痢の主要な要因は BCoV や BToV であり (65), BRVB や BRVC などが原因による成牛の下痢症も日本を含む世界中で散発的に報告されている (3, 31, 50)。しかし, BRVA が関与した成牛の下痢症は稀である。本症例では, 急性期の下痢便から下痢症の原因となり得るウイルス, 細菌および原虫などの病原体は検出されずに RVA のみが検出されたこと, また回復期の糞便から RVA は検出されなかったことから, Tottori-SG 株が成牛の流行性下痢の発生に関与していたと考えられた。日本では BRVA が関与した成牛の流行性下痢は過去に少なくとも 3 例報告されている (20, 57, 67)。3 例中 2 例で, 稀有な G8P[1] 遺伝子型の BRV16 株および G21P[29] 遺伝子型と思われる Tak2 株が下痢を呈した牛の糞便から分離された (20, 67)。成牛の RVA 感染症の発生要因の 1 つには, このような稀有な遺伝子型 RVA に対する免疫を保有しなかったことが考えられる。また過去に報告された成牛の下痢症と本症例との共通点として, 全ての症例は酪農家での発生であり, 仔牛に臨床症状が認められなかったことがあげられるが, 過去の 3 例は農場内においても限局的な発生であったのに対し, 本症例は搾乳牛全頭における集団発生であることの相違もあった。本症例では下痢の発生に伴い, 一過性の乳量減少が確認された。下痢は約 1 週間で終息したが, 乳量減少は発生から約 2 週間継続したため約 170,000 円の経済損失を招いた。今後, G15P[14] 遺伝子型 RVA による成牛の流行性下痢の発生機序を解明し, わが国における浸潤状況を調査するため, 感染実験による病原性の研究およびさらなる血清学的研究が必要である。

(A) VP7



(B) VP4

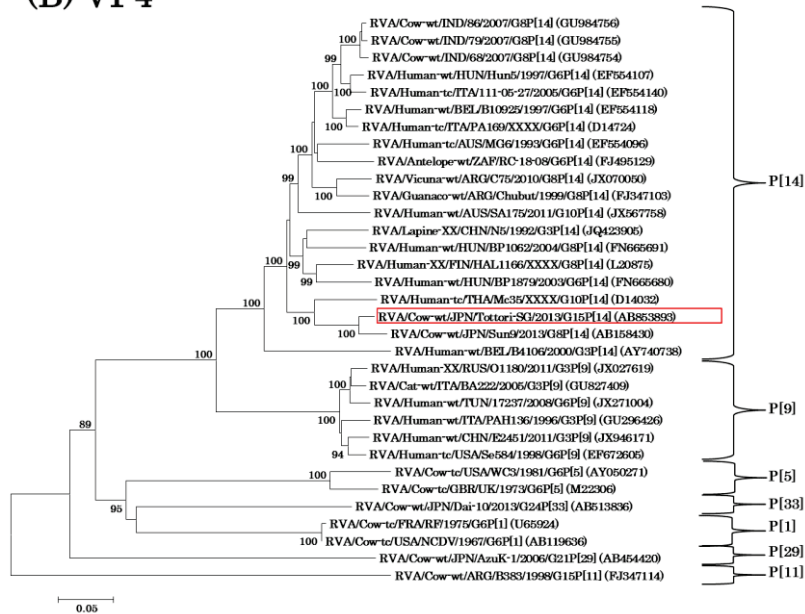


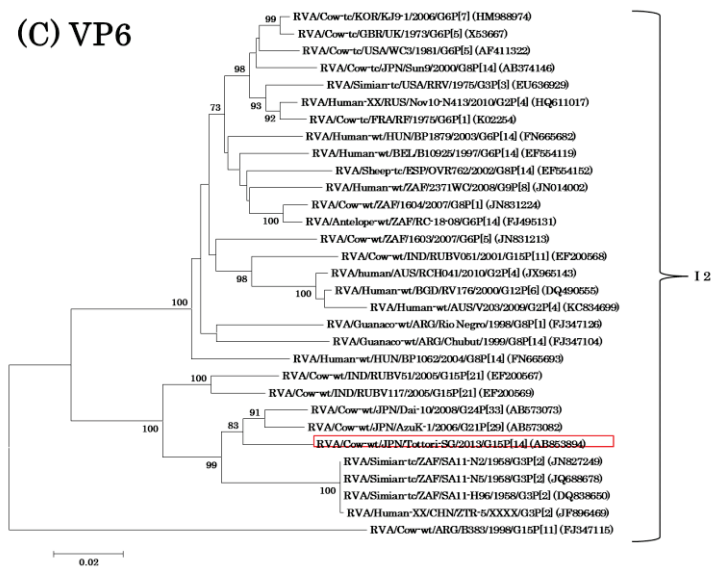
図 2-1 Tottori-SG 株の各塩基配列に基づく分子系統樹

- (A) VP7 遺伝子 (B) VP4 遺伝子 (C) VP6 遺伝子 (D) VP1 遺伝子
 (E) VP2 遺伝子 (F) VP3 遺伝子 (G) NSP1 遺伝子 (H) NSP2 遺伝子
 (I) NSP3 遺伝子 (J) NSP4 遺伝子 (K) NSP5 遺伝子

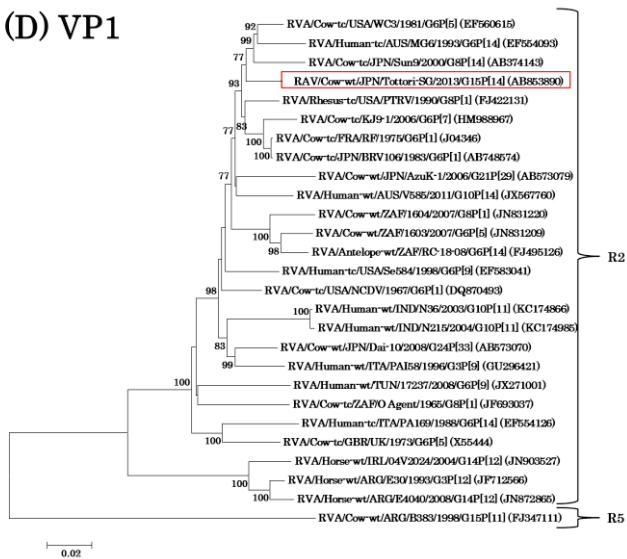
ブーツストラップ値を各グループの分岐に示す

RVA の遺伝子型を右側に示す, Tottori-SG 株は赤枠で示す

(C) VP6



(D) VP1



(E) VP2

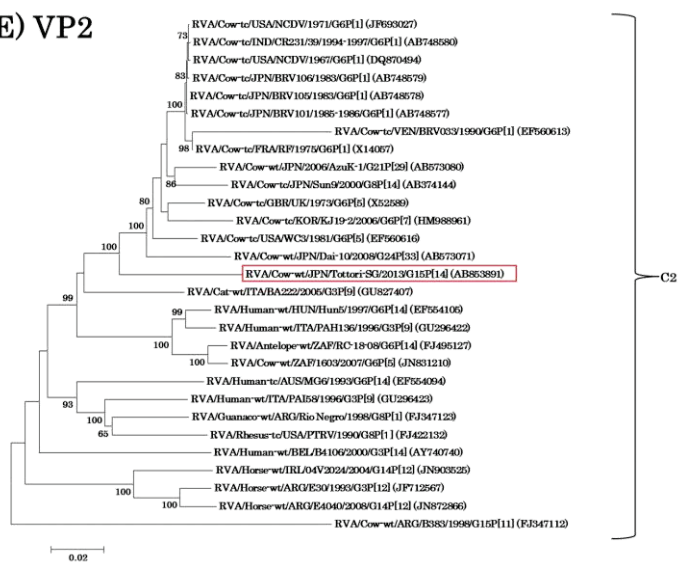
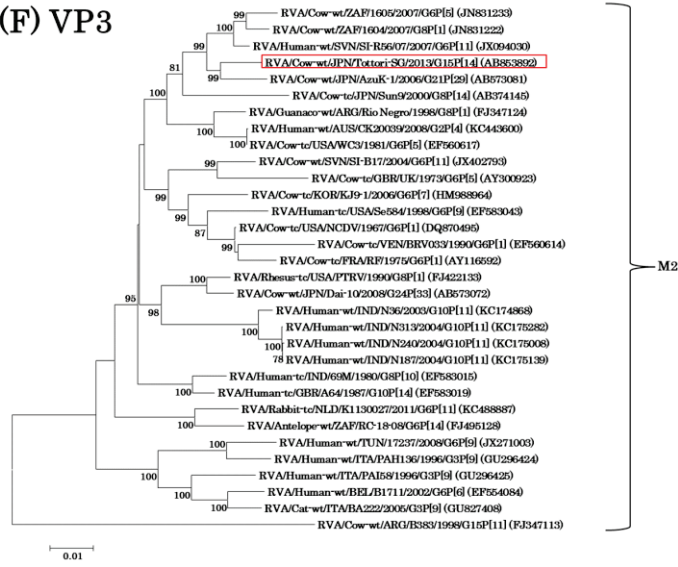
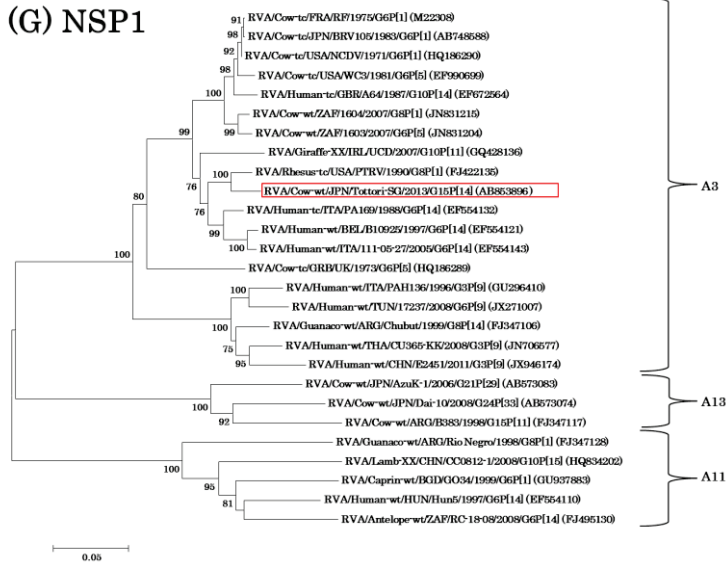


図 2-1 (続き)

(F) VP3



(G) NSP1



(H) NSP2

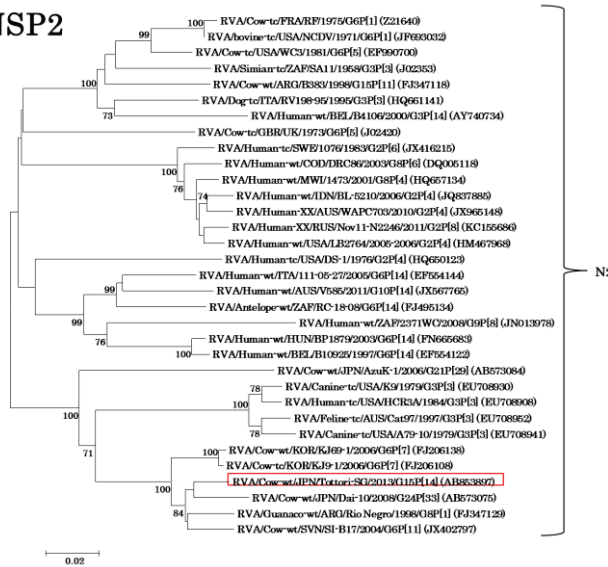
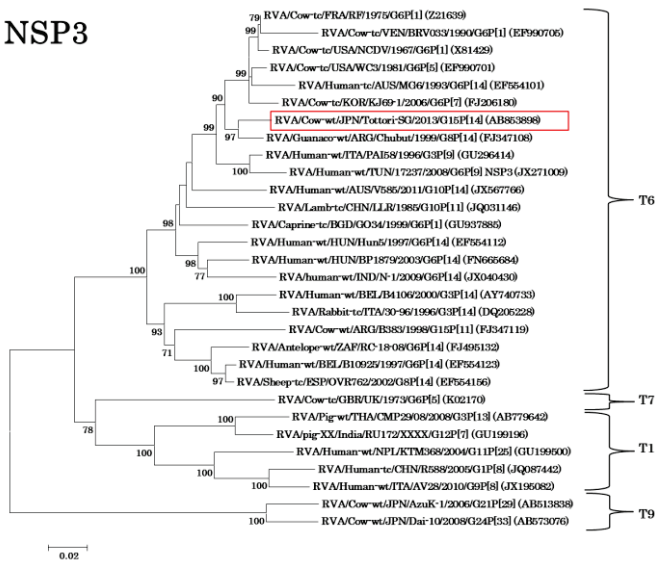
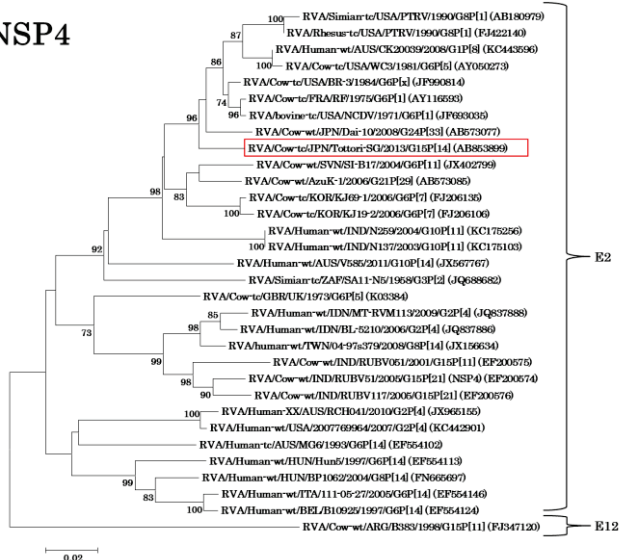


図 2-1 (続き)

(I) NSP3



(J) NSP4



(K) NSP5

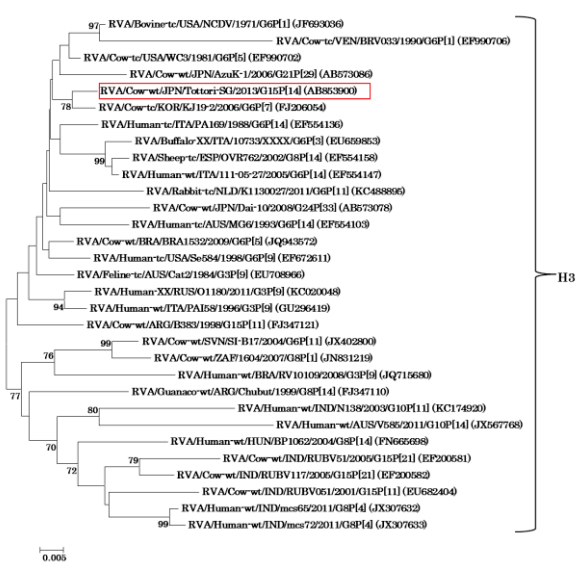


図 2-1 (続き)

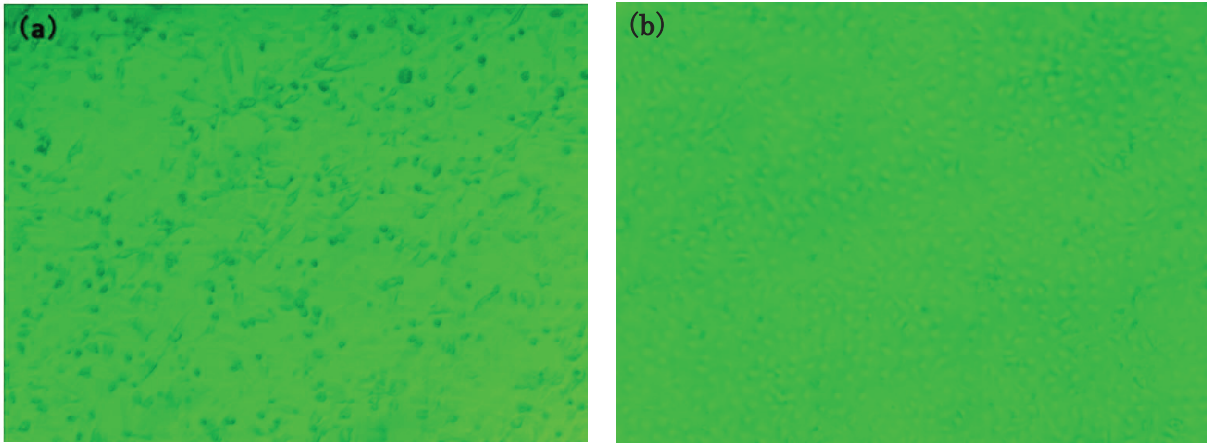


図 2-2 MA104 細胞における Tottori-SG 株の CPE

(a) Tottori-SG 株感染 MA104 細胞 (接種後 48 時間) (b) 正常 MA104 細胞

表2-1 Tottori-SGの各遺伝子分節と最も近縁な塩基配列

遺伝子	GeneBankに登録されている一致率が最も高い株				登録番号	一致率(%)	Tottori-SG 遺伝子型
	株名	動物種	地域				
VP7	RVA/Cow-wt/ARGB383/1998/G15P[11]	牛	アルゼンチン	FJ347116	89.9	G15	
VP4	RVA/Cow-tc/JPN/Sun9/2000G8P[14]	牛	日本	AB158430	95.8	P[14]	
VP6	RVA/Cow-wt/JPN/AzuK-1/2006/G21P[29]	牛	日本	AB573073	96.6	I2	
VP1	RVA/Cow-tc/FRA/RF/1975/G6P[1]	牛	フランス	J04346	97.2	R2	
VP2	RVA/Cow-tc/USA/NCDV/1967/G6P6[1]	牛	アメリカ	DQ87049	93.2	C2	
VP3	RVA/Cow-wt/JPN/AzuK-1/2006/G21P[29]	牛	日本	AB573081	96.9	M2	
NSP1	RVA/Rhesus-tc/USA/PTRV/1990/G8P[1]	アカゲザル	アメリカ	FJ422135	97.0	A3	
NSP2	RVA/Cow-wt/JPN/Dai-10/2008/G24P[33]	牛	日本	AB573075	96.7	N2	
NSP3	RVA/Guanaco-tc/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	ラマ	アルゼンチン	FJ347108	97.0	T6	
NSP4	RVA/Cow-tc/FRA/RF/1975/G6P[1]	牛	フランス	AY116593	97.2	E2	
NSP5	RVA/Cow-tc/KOR/KJ19-2/2006/G6P[7]	牛	韓国	FJ206054	98.9	H3	

表2-2 GeneBankに登録されている国内および国外の牛由来RVAとTottori-SGとの全11本のゲノム分節における塩基配列の相同性

株名	各遺伝子とTottori-SGとの一致率 (%)										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Cow-wt/JPN/Tottori-SG/2013/G15P[14]	G15 (100)	P[14] (100)	I2 (100)	R2 (100)	C2 (100)	M2 (100)	A3 (100)	N2 (100)	T6 (100)	E2 (100)	H3 (100)
国内の牛由来株											
RVA/Cow-tc/JPN/Sun9/2000/G8P[14]	G8 (72.0)	P[14] (95.8)	I2 (88.4)	R2 (96.0)	C2 (92.2)	M2 (94.1)					
RVA/Cow-wt/JPN/AzuK-1/2006/G21P[29]	G21 (71.6)	P[29] (64.7)	I2 (96.0)	R2 (96.4)	C2 (93.1)	M2 (96.9)	A13 (74.4)	N2 (89.4)	T9 (77.6)	E2 (94.5)	H3 (97.1)
RVA/Cow-wt/JPN/Dai-10/2008/G24P[33]	G24 (70.6)	P[33] (67.6)	I2 (96.6)	R2 (94.9)	C2 (92.2)	M2 (92.7)	A13 (73.0)	N2 (96.7)	T9 (78.1)	E2 (96.2)	H3 (97.0)
RVA/Cow-tc/JPN/BRV105/1983/G6P[1]	G6 (71.8)	P[1] (67.7)	I2 (87.7)	R2 (97.1)	C2 (93.2)	M2 (92.6)	A3 (92.9)	N2 (86.4)	T6 (96.0)	E2 (96.8)	H3 (97.5)
国外の牛由来株											
RVA/Cow-tc/USA/NCDDV/1967/G6P[1]	G6 (73.6)	P[1] (67.7)	I2 (88.3)	R2 (95.8)	C2 (93.2)	M2 (92.8)	A3 (93.2)	N2 (86.6)	T6 (95.7)	E2 (96.4)	H3 (98.3)
RVA/Cow-tc/FRA/RF/1975/G6P[1]	G6 (73.7)	P[1] (67.6)	I2 (88.2)	R2 (97.2)	C2 (93.1)	M2 (92.8)	A3 (93.1)	N2 (86.6)	T6 (96.1)	E2 (97.2)	H3 (97.4)
RVA/Cow-tc/UK/1973/G6P[5]	G6 (74.2)	P[5] (65.3)	I2 (88.8)	R2 (92.5)	C2 (92.6)	M2 (93.1)	A3 (87.8)	N2 (87.4)	T7 (83.0)	E2 (90.6)	H3 (93.1)
RVA/Cow-tc/USA/WC3/1981/G6P[5]	G6 (73.4)	P[5] (64.9)	I2 (88.3)	R2 (96.9)	C2 (93.0)	M2 (94.3)	A3 (92.8)	N2 (88.0)	T6 (95.7)	E2 (92.0)	H3 (97.4)
RVA/Cow-wt/ARG/BS83/1998/G15P[11]	G15 (89.9)	P[11] (60.2)	I2 (85.5)	R5 (80.7)	C2 (84.1)	M2 (85.9)	A13 (73.8)	N2 (87.7)	T6 (88.1)	E12 (87.5)	H3 (97.7)

空白欄は塩基配列が得られていないことを示す

第三章

豚下痢症関連ウイルス 4 種を迅速かつ同時に検出する

リアルタイム RT-PCR 法の開発

序 論

豚のウイルス性下痢症は、子豚の発育遅延や増体量の低下から養豚経営に損失を与える。下痢症の蔓延防止には正しい診断が必要であり、なおかつ迅速に診断を行うことは防疫対策を行う上で重要である。豚の下痢症を診断する上で臨床検査を行うが、PED と TGE はいずれも下痢と子豚の死亡といった同様な症状がみられ、臨床症状での識別は不能である。また、第一章で述べたように典型的な PED の症状を示さない、病勢の弱い PED が存在することが明らかとなり、病勢の比較的穏やかな PRVA との識別は難しい。さらに 2010 年に初めて香港で報告された PDCoV は、2014 年 2 月に米国で下痢や嘔吐を呈した豚から検出され、その後、北米を中心に流行が確認されている。(84)。わが国や韓国においても近年、PDCoV による下痢症の報告が散発しており(41)、国内に定着したと考えられている。PDCoV は経口投与による感染実験において、PEDV、TGEV および PRVA 同様に子豚の下痢に関連することが確認され、注意を要する疾病である(7, 34)。

現在、豚のウイルス性下痢症の診断には gel-based PCR 法が使われているが、第一章で述べた PEDV のように遺伝子に大きな欠損がある場合、そこを標的としたプライマーは欠損株を検出できない可能性がある。また、第二章で報告したように BRVA は多様な遺伝子を保有しており、PRVA においても同様な多様性が確認されている(46)。このことから、遺伝子診断に用いるプライマーは流行している株に合ったものでなければならないと考えられる。

牛の下痢症を迅速かつ省力的に検出する診断法として、BRVA、BRVB、BRVC、BCoV および BToV を検出するマルチプレックス gel-based PCR 法が現場で応用されている(21)。本章では豚の下痢症関連ウイルスの新たな診断法として PEDV、TGEV、

PDCoV および PRVA を特異的に，迅速かつ同時に検出可能な qPCR 法を開発し，さらに過去の野外病性鑑定材料を用いて，野外症例に応用可能かどうか確認を行った。

材料および方法

1. プライマーおよびプローブ

今回、qPCR法の開発に当たり、PEDVおよびPDCoVに使用するプライマー・プローブセットは、PEDVについては、S遺伝子欠損株にも対応することを塩基配列のアライメントで確認した上で既報のプライマー・プローブセット(37, 44)を使用した。TGEVおよびPRVAについてはわが国での流行株に対応した新たなプライマー・プローブセットを、遺伝的に保存性が高いN遺伝子とVP6遺伝子(39, 72, 81)を標的とし、GeneBankに登録されている国内株を含むTGEVとPRVA、それぞれ33株(うち1株は未登録の国内株)と51株の塩基配列を基に、PrimerQuest software (Integrated DNA Technologies, Inc, Iowa, USA) (IDT)を用いて設計した。設計したプライマー・プローブセットはNCBI BLASTを用いて特異性を確認した。本研究で使用するプライマー・プローブセットを表3-1に示す。プローブは5'末端をリポーター蛍光のFAM (6-Carboxyfluorecein), 3'末端をクエンチャー蛍光のTAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamine) でラベルした。

2. qPCR法の反応条件の検討

本研究ではコンタミネーションの防止および検査手技の簡便化を図るため、One-Step法を採用した。qPCR反応にはOne Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ(株), 滋賀)を用いた。10 μ lの2 \times One Step RT-PCR Buffer III, 2.8 μ lのRNAase-free H₂O, 0.4 μ lのTaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l), 0.4 μ lのPrimeScript RT enzyme Mix II, プライマーとプローブの濃度を各4 μ Mに調整した混合液1 μ lとRNA 5 μ lを混和し全20 μ lとした。qPCRはABI7300 (Life Technologies Inc, Carlsbad, U.S.A)を使用し、全てのプライマー・プローブセット

について同じ条件で実施した。反応条件は 42 °C 5 分の逆転写反応の後、95 °C 10 秒の酵素活性化後、熱変性 95 °C 5 秒、アニーリングと伸長反応を 60 °C 34 秒で 40 回繰り返した。蛍光シグナルはアニーリングと伸長反応のステップで検出した。ベースラインと閾値の設定は ABI7300 Software v1.4 (Life Technologies Inc, Carlsbad, U.S.A)を用いてオート解析で実施した。

3. qPCR 法の検出感度および解析性能についての評価

同じ反応条件における各反応の検出感度について、合成 DNA を用いた検証を行った。合成 DNA は qPCR 法で標的とした塩基配列をもとに設計し、IDT から購入した。それぞれの標的ウイルスの合成 DNA を 2.0×10^{-1} から 2.0×10^5 コピー/ μl に 10 倍段階希釈し qPCR 法を行った。1 反応につき 5 μl の段階希釈液を使用したため 1 ウェルにつき 1×10^0 から 1×10^6 コピーとなり、1 検体につき 2 ウェルで 2 回反復して実施した。検出限界 (LOD) は各反応において蛍光を検出することが出来た最低濃度とした。

今回の qPCR 法の解析性能を評価するため、合成 DNA の段階希釈列を用いた結果から検量線を作成し、それぞれの標的ウイルスに対するプライマー・プローブセットの PCR 効率 (E)、相関係数 (R^2) を計算した。E は検量線の傾きから計算した ($E = (10^{-1/\text{検量線の傾き}}) - 1$)。反応内変動と反応間変動は定量サイクル値 (Cq) から計算された変動係数 (CV) により評価した。

4. qPCR 法と gel-based PCR 法の感度比較

野外材料を用いて今回開発した qPCR 法と既報の gel-based PCR 法との感度比較の検証試験を行った。PEDV と PRVA は Vero 細胞および MA104 細胞を用いて、鳥取県で哺乳豚から分離されたウイルスを試験に供した。TGEV と PDCoV については、

これらのウイルスを含む鳥取県および岩手県の豚の糞便材料を試験に供した。ウイルス感染細胞培養上清および糞便懸濁液から QIAamp viral RNA mini kit (キアゲン(株), 東京) を用いて RNA を抽出し, それらの 10 倍段階希釈液を作製した後, 今回開発した qPCR 法および gel-based PCR 法を実施し, 感度の比較を行った。PEDV, TGEV および PRVA については既報のプライマーセット (28, 38) を, PDCoV については panncoronavirus 検出用プライマーセット (54) を用いた。全ての gel-based PCR 法は QIAGEN OneStep RT-PCR 法 Kit (キアゲン(株), 東京) を用いて実施した。

5. 野外病性鑑定材料

過去に鳥取県倉吉家畜保健衛生所および岩手県中央家畜保健衛生所にて病性鑑定を実施した豚の下痢症例のうち, PEDV, TGEV, PRVA および PDCoV に対する gel-based PCR 法 (28, 38, 54), qPCR 法 (44), ウイルス免疫血清を用いた免疫組織化学的検索, 常法によるサルモネラの検索および RVA 抗原検出イムノクロマト法 (ディップスティック ‘栄研 ‘ロタ) により診断されている 8 症例 23 検体を使用した。各症例の内訳は PED が 4 症例 15 検体 (うち 1 症例 1 検体は PDCoV との混合感染症), TGE が 1 症例 4 検体, PDCoV 感染症が 1 症例 1 検体, 原因不明症例が 1 症例 1 検体 (イムノクロマト法で RVA を検出), サルモネラのサーベイランスに用いたものが 2 症例 2 検体 (gel-based PCR 法で RVA を検出) であった。PDCoV 感染症については診断法が確立されていなかったため, PCR の増幅産物をダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し, NCBI BLAST プログラムにより既知の PDCoV と比較し, PDCoV の存在を確認した (データ示さず)。陰性対照として, 過去に鳥取県倉吉家畜保健衛生所にて病性鑑定を実施した豚の下痢症のうち, PED, TGE, PDCoV および RVA が検出されなかった 3 症例 22 検体を使用した。各症例の内訳は

PRVB 感染症 1 症例 1 検体，豚大腸菌症 1 症例 4 検体，原因不明症例 1 症例 17 検体であった。PRVB は gel-based PCR 法（40）で，病原性大腸菌については常法により診断した。発生状況および臨床症状，診断名等は表 4 に示す。

これらの糞便および小腸乳剤は，材料を EMEM で 10 倍希釈後，3,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を 0.45 μm シリンジフィルターで濾過後， -80°C で保存されていたものを使用した。

6. RNA 抽出および qPCR 法の実施

-80°C で保存されていた糞便および小腸乳剤を融解後，QIAamp Viral RNA Mini Kit（キアゲン(株)）を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA を用いて開発した qPCR 法を実施し，過去の病性鑑定の結果と比較した。

成 績

1. qPCR 法における各ウイルス遺伝子検出状況と反応時間

PEDV, TGEV, PDCoV および PRVA に対するプライマー・プローブセットにおいて各標的ウイルス遺伝子を同条件で増幅させることに成功した。また、これら 4 種の標的ウイルス遺伝子を RNA 抽出後、約 75 分で検出することが可能であった。

2. LOD

合成 DNA の段階希釈液を用いて実施した、PEDV, TGEV, PDCoV および PRVA に対する我々の開発した qPCR 法の検出限界は、それぞれ、100, 10, 10 および 10 コピー/反応であった (表 3-2)。

3. 検量線の評価

10 倍段階希釈した合成 DNA の測定結果から検量線を作成した。それぞれの標的ウイルスに対するプライマー・プローブセットのコピー数の定量範囲、 R^2 および E を図 3-1 と表 3-2 に示す。それぞれのプライマー・プローブセットの標準曲線の公式、 R^2 および E は、PEDV が $y=-3.3668x+40.622$, $R^2=0.9984$, $E=0.9816$, TGEV が $y=-3.3577x+37.497$, $R^2=0.9997$, $E=0.98528$, PDCoV が $y=-3.7063x+37.944$, $R^2=0.9953$, $E=0.86127$, PRVA が $y=-3.5924x+40.825$, $R^2=0.9993$, $E=0.8983$ であった。各ウイルスの検出効率においては、 R^2 は少なくとも 0.995 を示し、十分な定量範囲 (PEDV: 98.16%, TGEV: 98.52%, PDCoV: 86.12%, PRVA: 89.83%) であることが確認された。

4. 反復性と再現性

表 3-2 に全てのプライマー・プローブセットにおける反応内変動（反復性）と反応間精度（再現性）を示す。各 qPCR の反復性は、10 倍段階希釈の測定を 2 回反復することにより評価した。反復性試験の各希釈系の CV は、PEDV が 0.01% から 1.94%、TGEV が 0.13% から 4.98%、PDCoV が 0.05% から 5.00%、PRVA が 0.01% から 3.64% であった。再現性は別々に反応を 2 回行うことで評価した。再現性試験の各希釈系の CV は、PEDV が 1.91% から 4.41%、TGEV が 0.03% から 7.15%、PDCoV が 0.47% から 2.95%、PRVA が 0.12% から 3.20% であった。

5. qPCR 法と gel-based PCR 法の検出感度の比較

今回の qPCR 法と既報の gel-based PCR 法の検出限界を RNA の希釈倍数で示すと、PEDV は 10^5 と 10^5 倍、TGEV は 10^4 と 10^2 倍、PDCoV は 10^4 と 10^1 倍、PRVA は 10^4 と 10^2 倍であった（図 3-2）。

6. 野外病性鑑定材料への応用

表 3-4 に野外病性鑑定材料における開発した qPCR 法の検出成績を示す。qPCR 法では 23 検体中 22 検体で、標的ウイルスを検出することに成功した。しかし、検体 No.2 で qPCR 陰性となり、過去の病性鑑定成績と一致しなかった。検体 No.2 は gel-based PCR 法において同じ症例の他の 3 検体と比較して陽性反応が弱い検体であった。検体 No.19 は PEDV と TGEV の混合感染症例であったが、qPCR 法では両方のウイルスを問題なく検出できた。また全ての qPCR 標的ウイルス遺伝子陽性検体において偽陽性と考えられる反応は認められず、従来の診断法で陰性であった検体は全て qPCR 陰性であった。

考 察

代表的な豚の下痢症の原因ウイルスである PEDV および TGEV を同時に検出可能なマルチプレックス gel-based PCR 法や qPCR 法が報告されており、迅速診断法として広く用いられている (6, 37, 38, 90)。しかし、我々が知る限り、PEDV, TGEV, PDCoV および PRVA の 4 種の異なるウイルスを同時に検出可能な qPCR 法での検出系は報告されていない。また、qPCR 法は gel-based PCR 法と比較し、高感度で多量高速検体処理が可能といわれている (27, 36)。このため、本研究ではこれら 4 種のウイルスを同時に検出可能な qPCR 法の反応系を新たに開発した。本研究ではコンタミネーションのリスクを最小限に、反応時間を短縮するためにワンステップ法を採用した。PEDV と PDCoV については既報のプライマー・プローブセット (37, 44) を用いたが、TGEV と PRVA については保存性の高い領域、すなわち N 遺伝子および VP6 遺伝子を標的にし、新たにプライマー・プローブセットを設計した。全てのプライマー・プローブセットにおいて特異的に標的ウイルスの遺伝子を検出することに成功し、偽陽性反応も認められなかった。さらに全ての標的遺伝子を同条件で増幅させることが可能であるため、迅速診断にとって理想的な反応条件を確立することに成功した。今回の qPCR 法の検出限界は PEDV, TGEV, PDCoV および PRVA において、それぞれ 100, 10, 10 および 10 コピー/反応であった。この結果は既報の qPCR 法と同様、あるいはそれ以上の値であった (36, 37, 88)。また、qPCR 法は gel-based PCR 法と比較して検出感度が高いという報告が多数なされている (36, 70, 75, 77)。本研究では、臨床検体由来の各ウイルス RNA の 10 倍段階希釈液を用いて、qPCR 法と既報の gel-based PCR 法の感度について比較を実施した。その結果、今回の qPCR 法の検出感度は PEDV では同程度であったものの、TGEV, PDCoV および PRVA では 100 倍から 1000 倍高感度であった。

今回開発した qPCR 法の実際の臨床現場への応用を検討するため、過去に病性鑑定を実施した野外材料を用いて実施した。従来の診断法で陽性と診断された検体を用いた試験では、ほぼ全ての検体から標的ウイルスを特異的に検出することに成功した。しかし、PEDV の gel-based PCR 法において弱陽性反応が確認されていた検体 No.2 においてのみ qPCR 法で陰性となった。PEDV における gel-based PCR 法と qPCR 法の検出感度は同等であったことから、検体 No.2 における PEDV の遺伝子量が少なかつたために qPCR 法で検出できなかつたと考えられた。検体 No.1~4 は全て同じ症例の同腹哺乳豚であり、PEDV による激しい水様下痢とそれに伴う脱水が顕著であった。剖検所見において、小腸は顕著にひ薄化し、小腸内容が非常に常に少なかつたために、全ての検体から等量の材料を採取できず、No.2 の遺伝子量が少なくなつてしまつたと考えられた。症例 No.2 の検体 No.5~12 は第一章で述べた S 遺伝子に大きな欠損が認められた PEDV による症例である。S 遺伝子に欠損が認められたものの qPCR 法における標的遺伝子は N 遺伝子であるため、7 検体全て qPCR 法で検出可能であつた。また症例 1 とほぼ同じ日齢による哺乳豚の下痢症であつたが、臨床症状は軽度であり、小腸のひ薄化の程度も軽度であつたため、材料の採材用意で十分な検体を得ることが出来たため、7 検体全てで qPCR 陽性となつたと考えられた。

検体 No.19 は PEDV と PDCoV との混合感染症例である。qPCR 法では検体 No.19 より PEDV および PDCoV の両方を検出することが可能であり、複数のウイルスによる混合感染症例の診断にも本法は有効であることが示唆された。

本研究では、豚の下痢症関連ウイルス 4 種の遺伝子を迅速かつ特異的に検出することが可能な qPCR 法を開発した。本法はワンステップ法を採用しているため、手技が簡易でコンタミネーションの危険性も少ない。検出感度も既報の gel-based PCR 法と比較して同等またはそれ以上であり、各標的ウイルス遺伝子の検出時間も大幅に短縮された。このため豚の下痢症の迅速診断法として非常に有用であると考えられる。過

去の病性鑑定材料を用いて qPCR 法を実施した結果, 豚の下痢症の原因ウイルスを概ね検出することが可能で, 偽陽性反応も認められなかった。以上の成績から, 本研究で開発した qPCR 法は迅速かつ特異性の高い診断法として, 豚の下痢症の病性鑑定に非常に有用な手法であると考えられた。

表3-1 使用したプライマー・プローブセット

標的ウイルス	プライマー	標的遺伝子	配列(5'-3')	位置	増幅サイズ (bp)	引用文献 No.
PEDV	Forward		CGCAAAAGACTGAACCCACTAATTT			
	Reverse	Nucleocapside	TTGCCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT	26,679-26,876 ^{a)}	198	37
	Probe		TGTTGCCCATTTGCCACGACTCCTGC			
TGEV	Forward		AGCTATTGGACTTCAAAGGAAGATG			
	Reverse	Nucleocapside	CATAGGCATTAATCTGCTGAAGGAA	27,787-27,904 ^{b)}	118	本研究
	Probe		TCACGTTCACACACAAATACCACCTTGCCA			
PDCoV	Forward		ATCGACCACATGGCTCCAA			
	Reverse	Membrane	CAGCTCTTGCCCATGTAGCTT	23,413-23,484 ^{c)}	72	44
	Probe		CACACCAGTCGTTAAGCATGGCAAGCT			
PRVA	Forward		GCAAGCGCCACCAATTTATATTTTC			
	Reverse	VP6	TGCATACTCCTGACGTACYGAT	950-1,085 ^{d)}	136	本研究
	Probe		TGTGAATCTGTGCTTGCCGGAYGCTTC			

プローブは5'末端をFAM, 3'末端をTAMRA でラベルした

a) CV777株 全ゲノム (GenBank accession number: AF353511.1)の塩基番号に基づく

b) Purdue株 全ゲノム (GenBank accession number: AJ271965.2)の塩基番号に基づく

c) HKU15-44株 全ゲノム (GenBank accession number: JQ065042.1)の塩基番号に基づく

d) CMP107/02株 VP6遺伝子 (GenBank accession number: EU372775.1)の塩基番号に基づく

表 3-2 (a) qPCR における反応内変動 (反復性)

コピー数/反応	PEDV		TGEV				PDCoV				PRVA					
	Run1		Run2		Run1		Run2		Run1		Run2		Run1		Run2	
	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)
10 ⁶	20.40	1.08	18.68	1.94	17.39	0.88	15.07	4.98	15.52	1.01	16.47	1.28	19.14	0.89	20.40	1.08
10 ⁵	23.98	0.01	22.18	1.17	20.60	0.73	20.77	0.13	19.73	0.53	20.42	0.60	23.04	0.19	23.98	0.01
10 ⁴	27.06	1.03	25.68	1.04	24.16	0.95	23.21	0.60	23.29	3.29	23.79	0.07	26.47	0.55	27.06	1.03
10 ³	30.23	0.36	29.09	0.21	27.47	0.40	26.48	3.44	26.80	1.90	27.06	0.54	30.15	0.09	30.23	0.36
10 ²	34.11	0.33	32.73	0.18	30.63	0.22	30.47	0.71	29.71	5.00	30.40	0.05	33.35	0.60	34.11	0.33
10 ¹	38.48	1.40	-	-	34.22	0.57	34.24	2.26	34.78	0.64	35.18	2.33	37.36	3.64	38.48	1.40
10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 3-2 (b) qPCR における反応間変動 (再現性)

コピー数/反応	PEDV		TGEV		PDCoV		PRVA	
	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)	Average Cq	CV(%)
10 ⁶	19.54	4.41	16.23	7.15	16.00	2.95	19.77	3.20
10 ⁵	23.08	3.91	20.68	0.39	20.07	1.72	23.51	2.00
10 ⁴	26.37	2.61	23.68	2.01	23.54	1.08	26.76	1.10
10 ³	29.66	1.91	26.98	1.83	26.93	0.47	30.19	0.12
10 ²	33.42	2.07	30.55	0.26	30.06	1.16	33.73	1.13
10 ¹	-	-	34.23	0.03	34.98	0.58	37.92	1.48
10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-

Cq : 定量サイクル値, CV : 変動係数

表 3-3 各プライマー・プローブセットを用いた qPCR における
相関係数 (R^2) および PCR 効率 (E)

ウイルス	PEDV	TGEV	PDCoV	PRVA
R^2	0.9984	0.9997	0.9953	0.9993
E (%)	98.16	98.52	86.12	89.83

表 3-4 病性鑑定材料の詳細と qPCR 法による標的ウイルス検出成績*

標的ウイルス	症例No.	従来法による診断名 または採材目的	検体No.	材料	発育 ステージ	臨床症状	PEDV	TGEV	PDCoV	PRVA
PEDV	1	PED	1	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
		PED	2	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
		PED	3	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
		PED	4	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
	2	PED	5	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	6	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	7	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	8	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	9	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	10	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	11	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	12	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
3	PED	13	糞便乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-	
	PED	14	糞便乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-	
TGEV	4	TGE	15	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
		TGE	16	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
		TGE	17	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
		TGE	18	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
PDCoV	5	PEDVとPDCoVの混合感染症	19	糞便乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	+	-
		PDCoV感染症	20	糞便乳剤	6ヶ月齢	下痢	-	-	+	-
PRVA	6	サルモネラサーベランス ^{a)}	21	糞便乳剤	4ヶ月齢	臨床症状なし	-	-	-	+
		原因不明 ^{b)}	22	糞便乳剤	不明	不明	-	-	-	+
		サルモネラサーベランス ^{a)}	23	糞便乳剤	2ヶ月齢	臨床症状なし	-	-	-	+
陰性対照	9	PRVB感染症	24	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		豚大腸菌症	25	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
		豚大腸菌症	26	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
		豚大腸菌症	27	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
	10	豚大腸菌症	28	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
		原因不明	29	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	30	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	31	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	32	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	33	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	34	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	35	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
	11	原因不明	36	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	37	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	38	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
		原因不明	39	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
原因不明		40	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
原因不明		41	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
原因不明		42	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
原因不明		43	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
原因不明		44	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
原因不明		45	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	

* : qPCR 法陽性を+, 陰性を-で示す

a) 下痢などの臨床症状を呈さないが PRVA 遺伝子が検出された検体

b) 臨床症状は不明だが免疫クロマト法による検査で PRVA が検出された検体

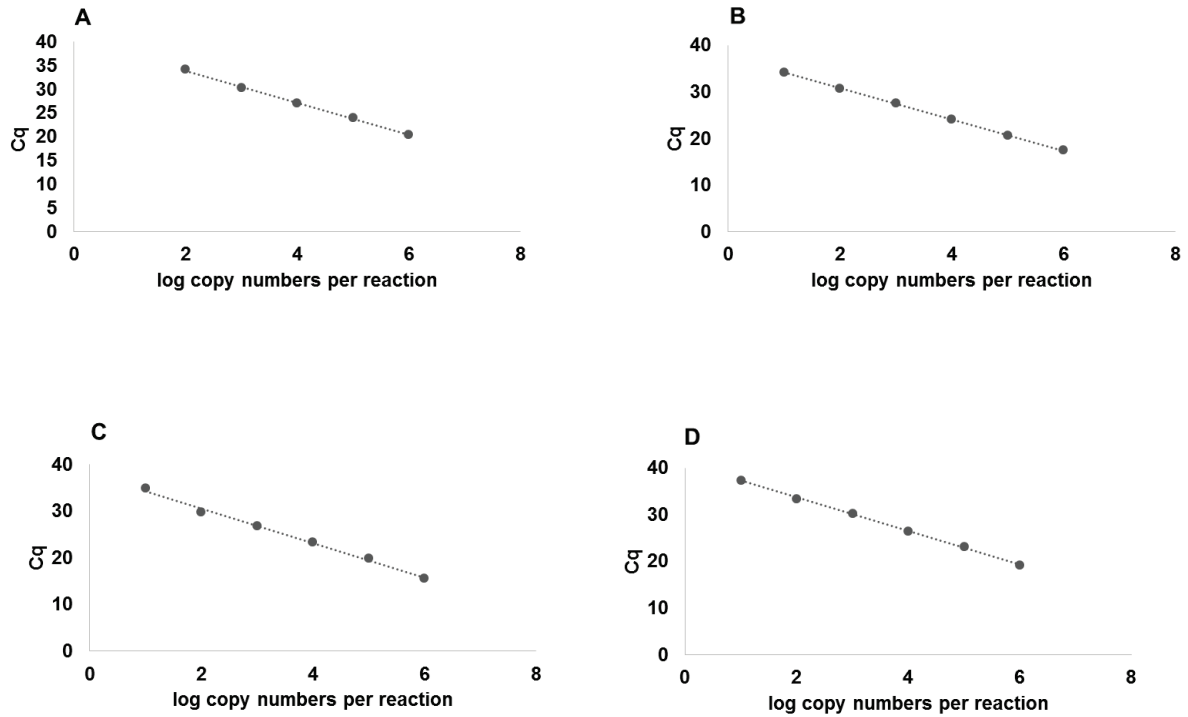


図 3-1 各プライマー・プローブセットにおける検量線

A : PEDV, B : TGEV, C : PDCoV, D : PRVA

縦軸に定量サイクル値 (Cq), 横軸に各標的遺伝子の塩基配列を含む合成 DNA のコピー数を対数で取り, これらのデータをプロットし検量線を作成した。





RNA希釈率	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	NC	
PEDV	qPCR Cq	25.1	28.3	32.8	36.0	38.4	—	—
	gel based PCR							←651bp
TGEV	qPCR Cq	24.6	28.8	33.1	36.0	—	—	—
	gel based PCR							←859bp
PDCoV	qPCR Cq	26.1	29.2	34.0	36.0	—	—	—
	gel based PCR							←251bp
PRVA	qPCR Cq	24.3	28.0	33.1	36.0	—	—	—
	gel based PCR							←1062bp

図 3-2 qPCR 法と gel-based PCR 法における
各ウイルスに対する検出感度の比較

qPCR 法において陽性の場合には定量サイクル値 (Cq)を示す。

qPCR 法と gel-based PCR 法の検出限界希釈率はそれぞれ以下のとおり。

PEDV : 10⁵ および 10⁵ 倍希釈

TGEV : 10⁴ および 10² 倍希釈

PDCoV : 10⁴ および 10 倍希釈

PRVA : 10⁴ および 10² 倍希釈

NC : 陰性対照

結 論

家畜の下痢症は畜産経営上大きな損失を与える要因の一つであり，その原因としてウイルス性のものが多く報告されている。ウイルス性下痢の原因として牛では BRVA や BCoV，豚においては PEDV や TGEV などが知られている。しかし，近年同じウイルスであっても臨床症状や発生状況が異なる症例が報告されており，その分子生物学的性状が注目されている。豚では PDCoV ように新しく下痢症の原因ウイルスとして報告されているものもある。これら下痢症関連ウイルスの診断において，培養細胞での分離が困難な場合が多く，診断法として標的ウイルスの gel-based PCR 法が広く用いられている。しかし，個別で実施する gel-based PCR 法は多くの労力と時間を要する。牛においては下痢症関連ウイルス 5 種を同時に検出するマルチプレックス gel-based PCR 法が報告されているが，豚においてはそのような迅速診断法はなく，新たな診断法の開発が望まれている。そこで，本研究では分離した通常とは異なる発生状況を示す PEDV と BRVA について，その分子生物学的性状を明らかにした。また診断に基づく迅速な防疫対応への貢献および診断方法の省力化を目的とし，豚の下痢症における迅速診断法を開発し，以下の成績を得た。

1. 2014 年に鳥取県において 2 症例の PED が発生した。3 月に発生した 1 症例目は哺乳豚の水様性下痢と脱水を主徴とし，高い死亡率を示す典型的な PED であった。しかし 10 月に発生した 2 症例目の PED は哺乳豚で下痢が認められるものの，1 症例目と比較して，その臨床症状は明らかに軽度で，下痢による死亡は 1 頭も確認されなかった。2 症例目から検出された PEDV の全ゲノム解析の結果，S 遺伝子領域の N 末端にのみ 194aa の大きな欠損を有していることが明らかになった。野外症例からこのような欠損株検出の報告は世界初であり，1 症例目と 2 症例目の PED は異なるウ

ウイルス株による発生と考えられた。このため PEDV の病原性は一様ではなく、株によっては従来の PED とは異なる発生状況を示す事が明らかになった。

2. PEDV と同属である TGEV の変異株と考えられている PRCV は S 遺伝子領域の N 末端側に 227aa の欠損が認められ、元株の TGEV と比較して病原性が減弱されていることが知られている。2 症例目の PED において検出された欠損株の欠損位置とサイズは、TGEV と PRCV との関係性に極めて類似していた。このため S 遺伝子 N 末端側の大きな欠損が従来の PEDV に比べて、病原性を減弱させている可能性が考えられた。

3. 2013 年に搾乳牛の集団下痢症に遭遇し、病性鑑定の結果、BRVA を検出した。成牛での BRVA による下痢症はあまり報告がなく、国内で 4 例目の報告となった。BCoV や BRVB, BRVC, BToV および BVDV などの下痢症関連ウイルス、サルモネラなどの病原性微生物は検出されなかったため、BRVA は成牛に対して集団下痢の原因となることが改めて示唆された。

4. 過去の成牛における BRVA による集団下痢において、3 症例中 2 症例で珍しい遺伝子型が報告されているため、検出された BRVA の全ゲノム解析を実施した。その結果、世界初となる G15P[14]遺伝子型 RVA を確認し、日本国内で検出されている BRVA の遺伝子再集合体である可能性が示唆された。BRVA が成牛の集団下痢を起こす要因として、このような珍しい遺伝子型に対して免疫応答が不十分であったためと推察された。

5. PEDV による感染症においても、その臨床症状が軽度である場合もあること、ま

た BRVA は成牛における集団下痢の原因となる場合があることが明らかになった。このため家畜の下痢症を臨床症状のみで特定することは非常に困難であり，病原診断に基づく防疫対応を実施するためには，迅速な診断法が必要であると考えられた。

6. 牛においては成牛下痢症 5 種 (BCoV, BRVA, BRVB, BRVC および BToV) を迅速に検出するマルチプレックス gel-based PCR 法が広く用いられているため，豚においても下痢症関連ウイルス 4 種 (PEDV, TGEV, PDCoV および PRVA) を迅速かつ同時に検出する qPCR 法を開発した。qPCR 法と既報の gel-based PCR 法との検出感度を比較した結果，PEDV では同程度であったものの，TGEV, PDCoV および PRVA では 100 倍から 1000 倍高感度であった。また qPCR 法は材料から RNA を抽出した後，これら 4 種の標的ウイルス遺伝子を約 75 分で検出することが可能で，大幅に検査時間が短縮された。

7. 過去に病性鑑定を実施した野外材料を用いて今回開発した qPCR 法を実施した。従来の診断法で陽性と診断された検体を用いた試験では，23 検体中 22 検体で標的ウイルスを特異的に検出することに成功した。しかし，PEDV の gel-based PCR において弱陽性反応が確認されていた 1 検体においてのみ qPCR で陰性となった。この原因として検体中の PEDV 量が少なかったことが考えられた。また全ての検体において偽陽性と考えられる反応は認められず，従来の診断法で陰性と診断された検体では 22 検体全て qPCR 法で陰性となった。以上の成績から，本研究で開発した qPCR 法は迅速かつ特異性の高い診断法として，豚の下痢症の病性鑑定に有用な手法であると考えられた。

本研究において，PEDV や RVA の遺伝的多様性と，これらのウイルスが関与する

感染症の発生状況は従来のものとは異なる場合があることが明らかになった。また PEDV, TGEV, PDCoV および PRVA を同時に検出可能な qPCR 法を確立し、その有用性を確認した。本法を病性鑑定に用いることで、養豚産業に重大な被害をもたらす豚の下痢症の防疫対応に大きく貢献できると考えられた。本研究で得られた知見が、未だ解明されていない部分の多い家畜の下痢症の性状解析や診断技術の向上の一助になることを期待したい。

謝 辞

本論文の作成にあたり終始、数多くのご指導、ご助言、激励を頂きました東京農工大学農学部国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授ならびに長井誠特任准教授に心より深謝いたします。水谷先生、長井先生には本研究の始まりから本論文草稿作成に至るまで終始ご指導いただき深く御礼申し上げます。また研究の遂行に際して、貴重なご指導、ご助言を頂きました同センターの土赤忍氏、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所ウイルス疫学研究領域の鈴木亨主任研究員、宮崎綾子主任研究員、亀山健一郎研究員を初めといたします皆様、鳥取大学医学部附属病院次世代高度医療推進センターの足羽朋子氏に深謝いたします。

本論文草稿作成にあたり、有益なご助言およびご校正を賜りました帯広畜産大学動物・食品検査診断センターの小川晴子教授、岩手大学実験動物学研究室の古市達哉教授、動物衛生研究所の筒井俊之ウイルス・疫学研究領域長、岐阜大学動物感染症制御学研究室の浅井鉄夫教授に厚く御礼申し上げます。

本研究への多大なるご理解とご支援を賜りました鳥取県倉吉家畜保健衛生所の山里比呂志所長に心より深謝いたします。研究に際して、多くのご助言を頂きました同所病性鑑定室の岡田綾子係長、中村耕太郎技師、大西恵美子氏、鳥取県西部家畜保健衛生所の岩尾健課長補佐、鳥取県農林水産部農業戦略監畜産課の小谷道子係長をはじめとする皆様、また岩手県農林水産部畜産課の福成和博氏、福島県県中家畜保健衛生所の佐藤敦子氏をはじめとする平成 22 年度家畜衛生講習会（ウイルス部門）の研修同期の皆様に深謝いたします。

最後に本研究の遂行、本論文の作成にあたり、貴重な時間を賜り、暖かく見守ってくれた家族に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。

引用文献

1. Abe, M., Ito, N., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Kanamaru, Y., Suzuki, H., Shibano, K., Arashi, Y. and Sugiyama, M. (2011). Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. *J. Gen. Virol.* 92, 952-960.
2. Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, Y., Kohara, J. and Sugiyama, M. (2009). Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Res.* 144, 250-257.
3. Aita, T., Kuwabara, M., Murayama, K., Sasagawa, Y., Yabe, S., Higuchi, R., Tamura, T., Miyazaki, A. and Tsunemitsu, H. (2012). Characterization of epidemic diarrhea outbreaks associated with bovine rotavirus in adult cows. *Arch. Virol.* 157, 423-431.
4. Anderson, E. J. and Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *Lancet. Infect. Dis.* 4, 91-99.
5. Arista, S., Vizzi, E., Alaimo, C., Palermo, D. and Cascio, A. (1999). Identification of human rotavirus strains with the P[14] genotype by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2706-2708.
6. Ben Salem, A. N., Chupin Sergei, A., Bjadovskaya Olga, P., Andreeva Olga, G., Mahjoub, A. and Prokhvatilova Larissa, B. (2010). Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *J. Virol. Methods.* 165, 283-293.
7. Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madson, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M. and Zhang, J. (2015).

- Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology*. 482, 51-59.
8. Chen, J., Liu, X., Shi, D., Shi, H., Zhang, X., Li, C., Chi, Y. and Feng, L. (2013) Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Viruses*. 5, 2601–2613
 9. Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., Gauger, P. C., Schwartz, K. J., Madson, D., Yoon, K. J., Stevenson, G. W., Burrough, E. R., Harmon, K. M., Main, R. G. and Zhang, J. (2014). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 52, 234-243.
 10. Chitambar, S. D., Arora, R., Kolpe, A. B., Yadav, M. M. and Raut, C. G. (2011). Molecular characterization of unusual bovine group A rotavirus G8P[14] strains identified in western India: emergence of P[14] genotype. *Vet. Microbiol.* 148, 384-388.
 11. Ciarlet, M., Estes, M. K. and Conner, M. E. (1997). Comparative amino acid sequence analysis of the outer capsid protein VP4 from four lapine rotavirus strains reveals identity with genotype P[14] human rotaviruses. *Arch. Virol.* 142, 1059-1069.
 12. Ciarlet, M., Hoffmann, C., Lorusso, E., Baselga, R., Cafiero, M. A., Bányai, K., Matthijssens, J., Parreño, V., de Grazia, S., Buonavoglia, C. and Martella, V. (2008). Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. *Virus Genes*. 37, 250-265.
 13. Cima, J. (2013). Viral disease affects U.S. pigs: porcine epidemic diarrhea

- found in at least 11 states. *J Am Vet Med Assoc.* 243, 30-31.
14. Cowley, D., Donato, C. M., Roczo-Farkas, S. and Kirkwood, C. D. (2013). Novel G10P[14] Rotavirus Strain, Northern Territory, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1324-1327.
 15. Dhama, K., Chauhan, R. S., Mahendran, M. and Malik, S. V. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33, 1-33.
 16. Doan, Y.H., Nakagomi, T., Aboudy, Y., Silberstein, I., Behar-Novat, E., Nakagomi, O. and Shulman, L.M. (2013). Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *J. Clin. Microbiol.* 51, 182-189.
 17. Estes, M. K. and Kapikian, A. Z. (2007). Rotaviruses and their replication. *In:* Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B. and Straus, S. E., [eds] *Fields Virology*, 5th ed., pp. 1917-1974. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
 18. Fukai, K., Saito, T., Inoue, K. and Sato, M. (2004). Molecular characterization of novel P[14], G8 bovine group A rotavirus, Sun9, isolated in Japan. *Virus Res.* 105, 101-106.
 19. Fukai, K., Sakai, T. and Kamata, H. (1998). Distribution of G serotypes and P genotypes of bovine group A rotavirus isolated in Japan. *Aust. Vet. J.* 76, 418-422.
 20. Fukai, K., Takahashi, T., Tajima, K., Koike, S., Iwane, K. and Inoue, K. (2007). Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. *Vet. Microbiol.* 123, 217-224.
 21. Fukuda, M., Kuga, K., Miyazaki, A., Suzuki, T., Tasei, K., Aita, T. and Mase, M.

- (2012). Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle. *Arch. Virol.* 157, 1063-1069.
22. Furuuchi, S., Shimizu, M., and Shimizu, Y. (1978). Field trials on transmissible gastroenteritis live virus vaccine in newborn piglets. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.* 18, 135-142.
23. Garaicoechea, L., Bok, K., Jones, L. R., Combessies, G., Odeón, A., Fernandez, F. and Parreño, V. (2006). Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Vet. Microbiol.* 118, 1-11.
24. Gerna, G., Sears, J., Hoshino, Y., Steele, A. D., Nakagomi, O., Sarasini, A. and Flores, J. (1994). Identification of a new VP4 serotype of human rotaviruses. *Virology.* 200, 66-71.
25. Ghosh, S., Samajdar, S., Sinha, M., Kobayashi, N., Taniguchi, K. and Naik, T. N. (2008). Molecular characterization of rare bovine group A rotavirus G15P[11] and G15P[21] strains from eastern India: identification of simian SA11-like VP6 genes in G15P[21] strains. *Virus Genes.* 37, 241-249.
26. Ghosh, S., Varghese, V., Samajdar, S., Sinha, M., Naik, T. N. and Kobayashi, N. (2007). Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P[14] and G10P[14] strains. *J. Clin. Microbiol.* 452, 2751-2753.
27. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C. (2001). An over view of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 25, 386-401.
28. Gouvea, Y., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B.

- and Fang, Z. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276-282.
29. Griffin, D. D., Fletcher, M., Levy, M. E., Ching-Lee, M., Nogami, R., Edwards, L., Peters, H., Montague, L., Gentsch, J. R. and Glass, R. I. (2002). Outbreaks of adult gastroenteritis traced to a single genotype of rotavirus. *J. Infect. Dis.* 185, 1502-1505.
30. Harada, K., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J. (1969). Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.* 9, 185-192.
31. Hayashi, M., Nagai, M., Hayakawa, Y., Takeuchi, K. and Tsunemitsu, H. (2001). Outbreak of diarrhoea and milk drop in cows infected with bovine group B rotavirus. *Vet. Rec.* 149, 331-332.
32. Ishizaki, H., Sakai, T., Shirahata, T., Taniguchi, K., Urasawa, T., Urasawa, S. and Goto, H. (1996). The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. *Vet. Microbiol.* 48, 367-372.
33. Johnson, M. W., Fitzgerald, G. R., Welter, M. W. and Welter, C. J. (1992). The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Med.* 4, 382-386.
34. Jung, K., Hu, H., Eyerly, B., Lu, Z., Chepngeno, J. and Saif, L. J. (2015). Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 650-654.
35. Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K. and Tsunemitsu, H. (2006). Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 350-354.

36. Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Duson, G., Neyts, J. and Van Ranst, M. (2006). Viral load quantitation of SARS-coronavirus RNA using a one-step real-time RT-PCR. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 32-37.
37. Kim, S. H., Kim, I. J., Pyo, H. M., Tark, D. S., Song, J. Y. and Hyun, B. H. (2007). Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *J. Virol. Methods.* 146, 172-177.
38. Kim, S. Y., Song, D. S. and Park, B. K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 516-520.
39. Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. and Tobler, K. (2001). Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes.* 23, 137-144.
40. Kuga, K., Miyazaki, A., Suzuki, T., Takagi, M., Hattori, N., Katsuda, K., Mase, M., Sugiyama, M. and Tsunemitsu, H. (2009). Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch. Virol.* 154, 1785-1795.
41. Lee, S. and Lee, C. (2014). Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus Strain KOR/KNU14-04/2014. *Genome Announc.* 2, 6.
42. Maes, P., Matthijnsens, J., Rahman, M. and Van Ranst, M. (2009). RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *MBC. Microbiol.* 9, 238.
43. Marston, D. A., McElhinney, L. M., Ellis, R. J., Horton, D. L., Wise, E. L., Leech, S. L., David, D., de Lamballerie, X. and Fooks, A. R. (2013). Next

- generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC. Genomics*. 14, 444.
44. Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K. and Rovira, A. (2014). Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1347-1350.
45. Marthaler, D., Jiang, Y., Otterson, T., Goyal, S., Rossow, K. and Collins, J. (2013). Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhoeavirus strain USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome Announc.* 1, e00555-13.
46. Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U. and Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397-1413.
47. Matthijnsens, J., Potgieter, C. A., Ciarlet, M., Parreño, V., Martella, V., Banyai, K., Garaicoechea, L., Palombo, E. A., Novo, L., Zeller, M., Arista, S., Gerna, G., Rahman, M. and Van Ranst, M. (2009). Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* 83, 2917-2929.
48. Matthijnsens, J., Rahman, M., Martella, V., Xuelei, Y., De Vos, S., De Leener, K., Ciarlet, M., Buonavoglia, C. and Van Ranst, M. (2006). Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 80, 3801-3810.
49. Matthijnsens, J., Taraporewala, Z. F., Yang, H., Rao, S., Yuan, L., Cao, D., Hoshino, Y., Mertens, P. P., Carner, G. R., McNeal, M., Sestak, K., Van Ranst,

- M. and Patton, J. T. (2010). Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J. Virol.* 84, 2013-2026.
50. Mawatari, T., Taneichi, A., Kawagoe, T., Hosokawa, M., Togashi, K. and Tsunemitsu, H. (2004). Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 887-890.
51. Midgley, S. E., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E., Falkenhorst, G. and Böttiger, B. (2012). Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiol. Infect.* 140, 1013-1017.
52. Miyazaki, A., Fukuda, M., Kuga, K., Takagi, M. and Tsunemitsu, H. (2010). Prevalence of antibodies against transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus among pigs in six regions in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 943-946.
53. Mlera, L., O'Neill, H. G., Jere, K. C. and van Dijk, A. A. (2013). Whole-genome consensus sequence analysis of a South African rotavirus SA11 sample reveals a mixed infection with two close derivatives of the SA11-H96 strain. *Arch. Virol.* 158, 1021-1030.
54. Moës, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., Pyrc, K., Berkhout, B., van der Hoek, L. and Van Ranst, M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC. Infect. Dis.* 5, 6
55. Mphahlele, M. J., Peenze, I. and Steele, A. D. (1999). Rotavirus strains bearing the VP4P[14] genotype recovered from South African children with

- diarrhoea. *Arch. Virol.* 144, 1027-1034.
56. Oka, T., Saif, L. J., Marthaler, D., Esseili, M. A., Meulia, T., Lin, C., Vlasova, A. N., Jung, K., Zhang, Y. and Wang, Q. (2014). Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet. Microbiol.* 173, 258-269.
57. Onuma, N., Kudo, K., Ogawa, S., Sakurada, M., Sunahara, E., Mawatari, T. and Tsunemitsu, H. (2003). The role of the group A rotavirus in adult-cow diarrhea. *J. Jpn. Vet. Assoc.* 56, 245-248.
58. Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Martella, V. and Bányai, K. (2013). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190-199.
59. Parreño, V., Bok, K., Fernandez, F. and Gomez, J. (2004). Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). *Arch. Virol.* 149, 2465-2471.
60. Pensaert, M. B. (1999). Porcine epidemic diarrhea. *In*: D'Allaire, B. E., Mengeling, S. and Taylor, L. W, [eds] *Diseases of Swine*, 8th ed., pp. 179-185, Iowa State University Press, Ames.
61. Pensaert, M. B. and de Bouck, P. (1978). A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58, 243-247.
62. Rao, C. D., Gowda, K. and Reddy, B. S. (2000). Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology.* 276, 104-113.

63. Saif, L. J. and Fernandez, F. M. (1996). Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 174 (Suppl 1), S98-S106.
64. Saif, L. J. and Wesley, R. D. (1999). Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. *In: D'Allaire, B. E., Mengeling, S. and Taylor, L. W, [eds] Diseases of Swine, 8th ed., pp. 295-325. Iowa State University Press, Ames.*
65. Saif, L. J., Brock, K. V., Redman, D. R. and Kohler, E. M. (1991). Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.* 128, 447-449.
66. Saif, L. J., Pensaert, M. B., Sestack, K., Yeo, S. G. and Jung, K. (2012). Coronaviruses. *In: Zimmerman J. J., and Karriker L. A., [eds] Diseases of Swine. 10th edn., pp. 501-524. Wiley-Blackwell, Ames.*
67. Sato, M., Nakagomi, T., Tajima, K., Ezura, K., Akashi, H. and Nakagomi, O. (1997). Isolation of serotype G8, P[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1266-1268.
68. Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods.* 5, 16-18.
69. Song, D. and Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis and vaccine. *Virus Genes.* 44, 167-175.
70. Subhadra. S., Kumar, S., Suryanarayana, V. V. and Sreenivasulu. D. (2014). Comparison of bluetongue virus detection and quantitation methods in south India. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 1307-1312.
71. Suzuki, T., Murakami, S., Takahashi, O., Kodera, A., Masuda, T., Itoh, S.,

- Miyazaki, A., Ohashi, S. and Tsutsui, T. (2015). Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infect. Genet. Evol.* 36, 363-368.
72. S´anchez, C. M., Jim´enez, G., Laviada, M. D., Correa, I., Sun´e, C., Bullido, M., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J. and Enjuanes, L. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology*. 174, 410–417.
73. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2719–2731.
74. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
75. Tang, J., Khan, S., Delmiglio, C. and Ward, L. I. (2014). Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqMan RT-PCR targeting the highly conserved 3'-UTR region. *J. Virol. Methods*. 201, 38-43.
76. 谷口孝喜 (2002) . レオウイルス -ロタウイルスの多様性とそれに対応した感染防御-. *ウイルス* 52, 141-146
77. Timsit, E., Maingourd, C., Le Dréan, E., Belloc, C., Seegers, H., Douart, A. and Assié, S. (2010). Evaluation of a commercial real-time reverse transcription polymerase chain reaction kit for the diagnosis of Bovine respiratory syncytial virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 238-241.
78. Tsuda, T. (1997). Porcine epidemic diarrhea : Its diagnosis and control. *Proc.*

- Jpn. Fig. Vet. Soc. 31, 21-28.
79. Tsunemitsu, H., Jiang, B. and Saif, L. J. (1996). Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch. Virol.* 141, 705-713.
80. Urasawa, T., Taniguchi, K., Kobayashi, N., Mise, K., Hasegawa, A., Yamazi, Y. and Urasawa, S. (1993). Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of a unique human rotavirus strain Mc35 with subgroup I and serotype 10 specificity. *Virology.* 195, 766-771.
81. Varghese, V., Das, S., Singh, Ng. B., Kojima, K., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Kobayashi, N. and Naik, T. N. (2004). Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. *Arch. Virol.* 149, 155-172.
82. Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P. and Paton, D. J. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309-323.
83. Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A. R., Collins, J. and Saif, L. J. (2014). Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1620-1628.
84. Wang, L., Byrum, B. and Zhang, Y. (2014). Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1227-1230.
85. Wang, L., Byrum, B. and Zhang, Y. (2014). New variant of porcine epidemic

- diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 917-919.
86. Watanabe, M., Nakagomi, T., Koshimura, Y. and Nakagomi, O. (2001). Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently-circulating human rotavirus strains. *Arch. Virol.* 146, 557-570.
87. Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lau, C. C., Tsang, A. K., Lau, J. H., Bai, R., Teng, J. L., Tsang, C. C., Wang, M., Zheng, B. J., Chan, K. H. and Yuen, K. Y. (2012). Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995-4008.
88. Yu, H. Q., Cai, X. Q., Lin, Z. X., Li, X. L., Yue, Q. Y., Li, R. and Zhu, X. Q. (2015). Rapid and specific detection of porcine parvovirus using real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) analysis. *BMC. Vet. Res.* 11, 46.
89. Zhang, X., Hasoksuz, M., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Stollar, S., Janies, D., Hadya, N., Tang, Y., Ghedin, E. and Saif, L. (2007). Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology.* 358, 424-435.
90. Zhao, J., Shi, B. J., Huang, X. G., Peng, M. Y., Zhang, X. M., He, D. N., Pang, R., Zhou, B. and Chen, P. Y. (2013). A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012. *J. Virol. Methods.* 194, 107-112